
THESE

Présentée à

L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

par

Lætitia FAURE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT

de Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Filière : Microbiologie et Biocatalyse industrielles

Homéostasie cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* : Etude des effets des acides faibles.

Soutenue le 2 décembre 2005 devant la commission d'examen :

Mr G. GHOMMIDH	Professeur, Montpellier 2	Rapporteur
Mr. B. BLONDIN	Professeur, Agro. Montpellier	Rapporteur
Mr M. RIGOULET	Professeur, Bordeaux 2	Rapporteur
<u>Mr. G. GOMA</u>	Professeur, INSA, Toulouse	Examineur
Mr J.L. FUENTES	Directeur de recherche des procédés, Lesaffre	Examineur
Mr. J.L. URIBELARREA	Professeur, INSA, Toulouse	Directeur de thèse

Cette thèse a été préparée au Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés UMR-CNRS 5504, UMR-INRA 792 du Département de Génie Biochimique et Alimentaire de l'INSA de Toulouse

Remerciements

*Ce travail de recherche a été réalisé au **Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés** de l'Institut National des Sciences Appliquées.*

*Je tiens à remercier les professeurs **Gérard Goma** et **Nic Lindley** pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et tout particulièrement **Gérard** pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Ces travaux ont été dirigés par le professeur **Jean Louis Uribe Larrea** que je tiens à remercier très sincèrement pour son encadrement scientifique, sa disponibilité, son important sens critique et pour nos très nombreuses conversations.*

*Merci également à **Jean Luc Fuentes** pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux de thèse et pour les enrichissantes discussions.*

*Je remercie les rapporteurs de cette thèse, **Charles Ghommidh**, professeur à Montpellier 2, **Bruno Blondin**, professeur à Agro.Montpellier et **Michel Rigoulet**, professeur à Bordeaux 2 pour avoir accepté de juger mon travail et pour les remarques constructives qui ont contribué à faire avancer le débat.*

*Toute ma sympathie et ma reconnaissance vont à l'ensemble du personnel du laboratoire et tout particulièrement aux « **fermentiers** » : Sandrine, Carole, Stéphane, Xavier, Luc, Carine, Nathalie, Michel, Marie-Odile.*

Merci à tous ceux qui m'ont permis de « m'évader » de temps en temps : Emma, Cécile, Fadhel, Gaëlle, Matthieu(χ), Soraya, Jérôme, Vincent, Laurent, Gilles, Kenza.

*Je remercie également toute **ma famille**, pour leurs encouragements permanents, **mes parents** pour leur amour et leur soutien sans faille et sans qui je ne serais jamais arrivée là.*

*Mes dernières pensées vont à **Olivier** qui a su faire preuve de beaucoup de compréhension et de patience lors des longues nuits et des week-end passés au laboratoire.*

Nom : FAURE

Prénom : Lætitia

Titre : Homéostasie cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* : Etude des effets des acides faibles.

Année : 2005

Lieu INSA Toulouse

281 pages

RESUME :

L'étude de l'homéostasie cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* dans la réponse à un stress imposé par un acide faible repose sur l'analyse cinétique de la réponse à des perturbations impulsionnelles réalisées sur des cultures à hautes densités cellulaires pour différents états métaboliques caractérisés par des modes opératoires originaux. Les études différentielles réalisées avec les acides propionique et sorbique montrent que la réponse se caractérise par une séquence évènementielle mettant en jeux différents mécanismes :

- une accumulation intracellulaire de l'acide par diffusion passive
- une régulation instantanée du pH intracellulaire par une activité ATPasique dans la mesure où le potentiel oxydatif peut satisfaire la demande énergétique induite avec un catabolisme des réserves carbohydratées
- un import de potassium avec une accumulation intracellulaire d'osmolytes en accord avec l'obtention d'une pression de turgescence limite
- une compartimentation intracellulaire des espèces ioniques
- une restauration temporisée de l'homéostasie caractérisée par une composition macromoléculaire, une distribution des flux et une énergétique cellulaire spécifiques d'un métabolisme balancé.

Selon les états physiologiques, l'acquis d'une adaptation catabolique transitoire est fortement dépendant de la dynamique des différents mécanismes identifiés.

Le dioxyde de carbone a été identifié comme effecteur acide co-induit lors des stress acides.

Il a été évalué la faisabilité d'une approche intégrative regroupant les données cinétiques et transcriptomiques afin de valider certaines hypothèses sur l'identification de fonctionnalités cellulaires mobilisées dans la réponse à un stress acide.

MOTS CLES :

Saccharomyces cerevisiae, fed-batch, homéostasie, acides faibles, transport cationique, pression de turgescence, analyse transcriptomique.

Lastname: FAURE

Firstname: Lætitia

Titre: Cellular homeostasis of *Saccharomyces cerevisiae*: Study of the weak acid effects.

Year: 2005

INSA Toulouse

281 pages

ABSTRACT :

The cellular homeostasis study of *Saccharomyces cerevisiae* to the weak acid stress response is based on the kinetic response analysis after pulses carried out on high cell density cultures for various stabilised metabolic states according to original procedures.

The differential studies with propionic and sorbic acids demonstrate that the response is characterized by a typical times sequence involving various mechanisms:

- Intracellular accumulation of the acid by passive diffusion
- Instantaneous regulation of the intracellular pH by an ATPase activity in so far as the oxidative potential can satisfy the induced energy request associated to the reserve carbohydrate catabolism
- Potassium import with an intracellular accumulation of osmolytes in agreement with a critical turgor pressure
- Intracellular segregation of the ionic species
- Time-lag homeostasis return characterized by a macromolecular composition, a carbon fluxes distribution and a cellular energetic in agreement to a balanced metabolism.

According to the physiological states, the achievement of a transitory catabolic adaptation can be correlated to the dynamics of the identified mechanisms.

The carbon dioxide is identified like an acid effector co-induced at the time of the acid stresses.

It was also evaluated the feasibility of an integrative approach gathering the kinetic and transcriptomic data in order to validate various assumptions on the identification of cellular functionalities for the acid stress response.

KEY WORDS:

Saccharomyces cerevisiae, fed batch, homeostasis, weak acids, cationic transport, turgor pressure, transcriptomic analysis

Table des matières

INTRODUCTION.....	13
CONTEXTE DE L'ETUDE.....	13
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
I. La levure de boulangerie.....	23
I.1. Physiologie de la levure.....	23
I.1.1. Le métabolisme oxydatif.....	23
I.1.2. Métabolisme fermentaire en anaérobiose.....	26
I.1.3. Métabolisme fermentaire en aérobiose.....	27
I.1.4. Effet Crabtree.....	28
I.1.5. Capacité respiratoire limite.....	29
I.1.6. Réserves en hydrates de carbone.....	31
I.1.7. Le transport chez la levure.....	35
I.2. Production de levures de boulangerie.....	36
I.3. Capacité fermentaire.....	37
I.3.1. Définition.....	37
I.3.2. Facteurs influençant la capacité fermentaire.....	38
II. Effets des acides faibles sur le métabolisme de <i>S. cerevisiae</i>	40
II.1. Transport des acides dans la cellule.....	42
II.1.1. Dissociation de l'acide en solution et entrée dans la cellule.....	42
II.1.2. Entrée des acides faibles à l'intérieur de la cellule par des transporteurs spécifiques.....	43
II.2. Descriptions des effets sur le métabolisme de <i>S. cerevisiae</i>	43
II.2.1. Le pH _i au cœur de la réponse cellulaire.....	44
II.2.2. Quel est le rôle des réserves intracellulaires en présence d'acides faibles ?.....	51
II.2.3. Aspect moléculaire d'un stress acide.....	52
II.2.4. Effets d'un stress acide selon les conditions de culture.....	56
II.2.5. Effet des acides sur la capacité fermentaire de la levure.....	57
II.2.6. Le CO ₂ peut-il être considéré comme un acide faible ?.....	57
II.3. Mécanismes de résistance aux acides mis en place par la levure.....	59
II.3.1. Définition de la résistance ou adaptation à un acide faible.....	60
II.3.2. Régulation métabolique plus efficace et dégradation des acides, exemple de <i>Z. bailii</i>	60
II.3.3. Acquisition de fonctionnalités nouvelles pour <i>S. cerevisiae</i>	62
III. Pression osmotique de la levure.....	67
III.1.1. Rôle du glycérol.....	68
III.1.2. Rôle du tréhalose.....	68
III.1.3. Les cations.....	68
III.1.4. Aspect moléculaire d'un stress osmotique.....	69
IV. Conclusion.....	70
MATERIEL ET METHODES.....	71
I. Souche et milieux de culture.....	73
I.1. Souche.....	73

I.2.	Milieux de culture	73
I.2.1.	Milieu riche	73
I.2.2.	Milieu minimum.....	73
II.	Conditions de culture	75
II.1.	Inoculum	75
II.2.	Précultures	75
II.3.	Cultures en fermenteur de 20 L.....	76
II.3.1.	Commande des débits.....	77
II.3.2.	Principe de la régulation PID de l'apport de glucose.....	79
II.3.3.	Prise d'échantillons	81
III.	Techniques analytiques	81
III.1.	Mesure de la concentration en biomasse.....	81
III.1.1.	Mesure turbidimétrique	81
III.1.2.	Mesure gravimétrique.....	81
III.2.	Analyse des surnageants de culture	82
III.2.1.	Glucose par un kit enzymatique (Référence Sigma diagnostic glucose 510 A).....	82
III.2.2.	Co-métabolites	82
III.2.3.	Les acides faibles ajoutés	83
III.2.4.	Détermination de l'azote ammoniacal résiduel.....	83
III.3.	Calculs de la concentration intracellulaire en cations	84
III.4.	Dosage des sucres de réserves	84
III.5.	Dosage des métabolites intracellulaires	85
III.6.	Détermination de la pression osmotique.....	85
III.7.	Mesure de la capacité fermentaire de la levure en présence ou non d'acide	86
III.8.	Mesure du volume intracellulaire par thermogravimétrie	86
III.9.	Analyse de la respiration cellulaire.....	87
III.9.1.	Analyse des gaz en sortie de fermenteur	87
III.9.2.	Détermination de la respiration cellulaire hors fermenteur.....	88
III.10.	Analyse élémentaire de la biomasse	89
III.11.	Analyse transcriptomique	89
III.11.1.	Récupération des cellules et broyage cellulaire	90
III.11.2.	Extraction des ARN totaux.....	90
III.11.3.	Rétro-transcription et marquage des ARN totaux.....	90
III.11.4.	Hybridation et lavage	91
III.11.5.	Scan et traitements.....	91
IV.	Traitement des données expérimentales.....	92
IV.1.	Gaz de fermentation.....	92
IV.2.	Traitement des variables	96
IV.2.1.	Calculs des vitesses spécifiques, des rendements et du coefficient respiratoire	97
IV.2.2.	Calculs des bilans carbone et redox.....	98
RESULTATS		101
CHAPITRE I : MISE EN ŒUVRE DU MICRO-ORGANISME. CARACTERISTIQUES METABOLIQUES DE LA SOUCHE. METHODOLOGIE DE TRAVAIL.		103

I.	Introduction	105
II.	Optimisation du milieu de culture	105
II.1.	Déroulement de la culture	106
II.2.	Résultats.....	106
II.3.	Conclusion	107
III.	Validation du milieu de culture et paramètres métaboliques de la souche	109
III.1.	Mise en œuvre	109
III.2.	Résultats	110
III.2.1.	Potentialités du nouveau milieu de culture.....	110
III.2.2.	Caractéristiques de la souche.....	110
III.3.	Conclusion.....	112
IV.	Méthodologie de travail	113
IV.1.	Conduites de la fermentation	113
IV.2.	Définition des paramètres des cultures	114
IV.2.1.	Cultures de type fed-batch.....	114
IV.2.2.	Pourquoi travailler à des taux de croissance faibles ?.....	115
IV.2.3.	Régime stabilisé pour l'étude des acides faibles.....	116
IV.3.	Calcul du pH_i	116
IV.3.1.	Problèmes liés à la mesure du pH_i	117
IV.3.2.	Récupération du surnageant de culture.....	118
IV.3.3.	Détails du calcul du pH_i	119
IV.3.4.	Validité de notre mesure.....	122
IV.4.	Calcul de la vitesse spécifique de consommation de l'acide.....	123
V.	Conclusion.....	124
CHAPITRE II : REPONSE DE LA LEVURE A L'ACIDE PROPIONIQUE EN MODE OXYDATIF		125
I.	Introduction	127
II.	Etude préliminaire.....	127
III.	Réponse générale de la levure à un pulse d'acide propionique	128
III.1.	Conditions de culture.....	128
III.2.	Variables macroscopiques	128
III.3.	Dégradation de l'acide propionique.....	132
III.4.	Cations intracellulaires	132
III.5.	Dégradation des sucres de réserves.....	134
III.6.	Métabolites intracellulaires.....	134
III.7.	Bilans carbone et redox au cours de la réponse à un pulse acide	135
III.8.	Comparaison pour différentes conditions de culture.....	137
III.8.1.	Cultures réalisées.....	137
III.8.2.	Résultats	138
III.9.	Discussion.....	140
III.9.1.	Dissipation instantanée d'énergie et entrée de cations.....	140
III.9.2.	Consommation des sucres de réserves : rôle de la pression osmotique intracellulaire ?.....	142
III.9.3.	Retour progressif à un métabolisme balancé : accumulation des sucres de réserves	143
III.9.4.	Retour à l'état initial, rétention vacuolaire des cations	143
III.9.5.	Le deuxième pulse semble indiquer une pression de turgescence critique	144

IV.	Mécanismes d'« adaptation » de la levure	145
IV.1.	Respiration de la levure hors réacteur.....	145
IV.1.1.	Dynamiques de réponse en respirométrie	146
IV.1.2.	Influence du pH.....	147
IV.1.3.	Influence du « vécu » de la levure.....	148
IV.1.4.	Conclusions sur la capacité respiratoire hors ligne de la levure	148
IV.2.	Capacité fermentaire à forte pression osmotique	149
IV.2.1.	Inhibition de la capacité fermentaire pour des cellules cultivées en absence d'acide	150
IV.2.2.	Les levures ayant été exposées à l'acide montrent temporairement une plus faible inhibition de la capacité fermentaire.....	150
IV.2.3.	Présence d'un débit constant d'acide.....	152
IV.3.	Conclusion.....	154
CHAPITRE III : IMPLICATION DE L'ENERGETIQUE CELLULAIRE DANS LA REPONSE AU STRESS ACIDE ET A L'« ADAPTATION ».....		157
I.	Introduction	159
II.	Rôle des réserves intracellulaires	160
II.1.	Conduite de la culture	160
II.2.	Résultats.....	161
II.2.1.	Variables macroscopiques	161
II.2.2.	Acide propionique	163
II.2.3.	Cations intracellulaires	164
II.2.4.	Réserves intracellulaires	165
II.2.5.	Capacité fermentaire de la levure	166
II.3.	Discussion.....	167
II.3.1.	L'énergie dissipée lors de la phase a est équivalente en condition de carence azotée et en seule limitation carbone	167
II.3.2.	La teneur initiale en sucres de réserves ne détermine pas l'amplitude de dégradation	168
II.3.3.	Schéma identique de réponse à l'acide propionique	168
II.3.4.	Le tréhalose, agent protecteur ?	169
III.	Pulses d'acide propionique en métabolisme oxydo-réductif	171
III.1.	Conduite de la culture.....	171
III.2.	Résultats	172
III.2.1.	Acide propionique et co-métabolites	174
III.2.2.	Cations intracellulaires	176
III.2.3.	Réserves intracellulaires	177
III.2.4.	Capacité fermentaire.....	179
III.3.	Discussion.....	179
CHAPITRE IV : EFFECTEURS NON METABOLISABLES ET GENES : L'ACIDE SORBIQUE ET LE CO₂, EN METABOLISME OXYDATIF		187
I.	Introduction	189
II.	L'acide sorbique.....	189
II.1.	Etudes préliminaires.....	189
II.2.	Pulses successifs d'acide sorbique	190
II.2.1.	Conduite de la culture.....	190

II.2.2.	Réponses des variables macroscopiques.....	191
II.2.3.	Evolution des pools cationiques et sorbiques	193
II.2.4.	Les sucres de réserves	197
II.2.5.	Capacité fermentaire.....	198
III.	Le CO ₂	202
III.1.	Conduite de la culture.....	203
III.2.	Résultats	204
III.3.	Conclusions	206
CHAPITRE V : ANALYSE INTEGREE DES VARIABLES MACROCINETIQUES ET CELLULAIRES		209
CHAPITRE VI : ANALYSE DE LA REPOSE TRANSCRIPTOMIQUE A UN PULSE D'ACIDES FAIBLES		217
I.	Introduction	219
II.	Traitement des données	220
II.1.	Principe de l'analyse par regroupement des profils d'expression	220
II.2.	Regroupement hiérarchique utilisé.....	221
III.	Analyse de la réponse à l'acide propionique	224
III.1.	Analyse préliminaire : validation de l'échantillonnage.....	225
III.2.	Analyse de la cinétique transcriptomique	228
III.2.1.	Réponse primaire à l'acide	229
III.2.2.	Analyse cinétique de l'expression	230
III.2.3.	Analyse statistique.....	232
III.2.4.	Conclusions	241
IV.	Analyse de la réponse à l'acide sorbique	242
IV.1.	Répartition en classes cinétiques	243
V.	Analyse des gènes communs entre les acides sorbique et propionique.....	247
V.1.	Spécificité de l'acide sorbique	249
V.2.	Comparaison avec d'autres analyses transcriptomiques de la littérature.....	250
VI.	Conclusions Discussion.....	251
VI.1.	Limites des traitements des données	252
VI.2.	Bilan de l'analyse transcriptomique	252
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		255
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		261
NOMENCLATURE ET ABREVIATIONS.....		277

Table des figures

FIGURE 1 : GLYCOLYSE, CYCLE DE KREBS ET FERMENTATION CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i> ..	24
FIGURE 2 : SCHEMA DU COMPORTEMENT METABOLIQUE DE <i>S. CEREVISIAE</i> EN CULTURE CONTINUE AEREE EN FONCTION DU TAUX DE DILUTION AVEC EN A LA CONCENTRATION EN BIOMASSE ET EN B LA VITESSE SPECIFIQUE DE RESPIRATION.....	29
FIGURE 3 : CAPACITE RESPIRATOIRE LIMITE DE <i>S. CEREVISIAE</i> AVEC A : EXCES DE GLUCOSE FERMENTE, B : DEUXIEME SUBSTRAT CONSOMME, C : DEUXIEME SUBSTRAT EN EXCES, FERMENTE.	30
FIGURE 4 : EVOLUTION DE LA CAPACITE RESPIRATOIRE ET DE LA VITESSE SPECIFIQUE DE CONSOMMATION D'OXYGENE EXPRIMEES MMOL.G DE BIOMASSE ⁻¹ .H ⁻¹ . LA CAPACITE RESPIRATOIRE A ETE DETERMINEE EN RESPIROMETRE EN CONDITIONS D'EXCES DE GLUCOSE.	31
FIGURE 5 : VOIES DE SYNTHESE ET DE DEGRADATION DU TREHALOSE ET DU GLYCOGENE CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i>	32
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PROCEDES METABOLIQUES QUI POURRAIENT EXERCER UN CONTROLE SUR LA CAPACITE FERMENTAIRE DE <i>S. CEREVISIAE</i>	38
FIGURE 7 : EFFET DU TAUX DE DILUTION SUR LA CAPACITE FERMENTAIRE DE <i>S. CEREVISIAE</i> MESUREE HORS LIGNE AVEC $\mu_c = 0,28 \text{ h}^{-1}$. LA CAPACITE FERMENTAIRE (Q_{ETHANOL}) EST MESUREE EN CONDITIONS D'ANAEROBIOSE SUR MILIEU SYNTHETIQUE ET EST EXPRIMEE EN MMOL D'ETHANOL PRODUITES.G DE BIOMASSE ⁻¹ .H ⁻¹	40
FIGURE 8 : EQUILIBRE DES DIFFERENTES FORMES D'UN ACIDE FAIBLE ENTRE LE MILIEU EXTERIEUR ET LE CYTOSOL.	42
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EFFET DECOUPLANT DES ACIDES AU NIVEAU DE LA MEMBRANE PLASMIQUE.. ...	49
FIGURE 10 : CONSOMMATION SPECIFIQUE D'OXYGENE EN CULTURE CONTINUE AEREE SUR GLUCOSE EN ABSENCE OU EN PRESENCE DE L'ACIDE BENZOÏQUE.	50
FIGURE 11 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTES ESPECES DU DIOXYDE DE CARBONE SELON LES EQUILIBRES IONIQUES. .	59
FIGURE 12 : MODELE SCHEMATIQUE DE L'ACTION POTENTIELLE DE PDR12P POUR AIDER <i>S. CEREVISIAE</i> A CONTRECARRER LES EFFETS INHIBITEURS DES ACIDES ORGANIQUES SOLUBLES DANS L'EAU.	63
FIGURE 13 : VOIES DE DEGRADATION DE L'ACIDE PROPIONIQUE. (A) VOIE DU METHYLMALONYL-CoA, LE PRODUIT DE DEGRADATION EST LE PYRUVATE ; (B) VOIE DU 2-METHYLCITRATE.....	66
FIGURE 14 : SCHEMA DU REACTEUR INSTRUMENTE EN CULTURE DE TYPE FED-BATCH.	76
FIGURE 15 : PRESENTATION DES MODES DE COMMANDE EFFECTUES SUR L'APPORT DE SUBSTRAT DANS LE REACTEUR LORS D'UNE CULTURE DE TYPE FED-BATCH.	77
FIGURE 16 : PRINCIPE DE LA COMMANDE PID DU DEBIT DE SUBSTRAT, BASE SUR LA MESURE DU COEFFICIENT RESPIRATOIRE OU DE L'ETHANOL DANS LES GAZ DE SORTIE DU REACTEUR.....	80
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODULE DE FILTRATION TANGENTIELLE.	81
FIGURE 18 : CINETIQUE DE SECHAGE D'UN ECHANTILLON DE BIOMASSE POUR LA DETERMINATION DU VOLUME CYTOSOLIQUE OBTENUE APRES TRAITEMENT SOUS MATLAB.....	86
FIGURE 19 : SCHEMA DE CONNEXION DE L'ANALYSEUR DE GAZ.....	88
FIGURE 20 : SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DU RESPIROMETRE.	89
FIGURE 21 : PARAMETRES DE CALCUL DES BILANS GAZEUX.	92
FIGURE 22 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE, DE LA VITESSE SPECIFIQUE DE RESPIRATION ET DU COEFFICIENT RESPIRATOIRE (QR) EN FONCTION DU TEMPS. LES FLECHES INDIQUENT LES LIMITATIONS NUTRITIONNELLES.....	107
FIGURE 23 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE ET DU DEBIT DE GLUCOSE SELON LE MODE DE CONDUITE DE LA CULTURE. PHASE A : DEBIT EXPONENTIEL DE GLUCOSE $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$, PHASE B : CONTROLE PID DU DEBIT DE SUCRE ET PHASE C : DEBITS EXPONENTIELS DE GLUCOSE POUR DES TAUX DE CROISSANCE DE $0,1 \text{ h}^{-1}$ ET $0,05 \text{ h}^{-1}$	109
FIGURE 24 : EVOLUTION DE LA PO2 ET DU COEFFICIENT RESPIRATOIRE SUR LES QUINZE PREMIERES HEURES DE LA CULTURE. LA FLECHE DESIGNER L'AUGMENTATION DE L'AGITATION.	113
FIGURE 25 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE ET DU FLUX D'APPORT DE GLUCOSE EN FONCTION DE LA CONDUITE DE LA CULTURE. CONDUITE STANDARD DES CULTURES REALISEES AVEC DEUX PHASES DE CROISSANCE, UNE PREMIERE RAPIDE A UN TAUX DE CROISSANCE DE $0,2 \text{ h}^{-1}$ ET UNE PHASE OU LE TAUX DE CROISSANCE EST DIMINUE A LA CONSIGNE DE TRAVAIL, ICI A $0,1 \text{ h}^{-1}$	114

FIGURE 26 : EVOLUTION DU K_LA , DE LA CROISSANCE CELLULAIRE ET DU VOLUME DU FERMENTEUR POUR UNE CONDUITE DE TYPE FED-BATCH. LES FLECHES INDIQUENT DES CHANGEMENTS DANS LES CONDITIONS D'AERATION ET D'AGITATION.	115
FIGURE 27 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EXOCELLULAIRE EN ACIDE PROPIONIQUE AU COURS DU TEMPS ET EN FONCTION DES DEUX MODES DE PRELEVEMENTS.	119
FIGURE 28 : EVOLUTION DES VARIABLES MACROSCOPIQUES POUR LA CULTURE DE REFERENCE SUITE A DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE INDIQUES PAR LES FLECHES. A : $DO_{600\text{ nm}}$, CONCENTRATION CELLULAIRE ET R_{NH_3} . B : QR , R_{O_2} , R_{CO_2}	128
FIGURE 29 : EVOLUTION DES VITESSES SPECIFIQUES DE CONSOMMATION D'OXYGENE THEORIQUE ET REELLE. A : SUITE A DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE INDIQUES PAR DES FLECHES. B : SUITE AU PREMIER PULSE D'ACIDE, VITESSE DE RESPIRATION DIVISEE EN 4 PHASES DISTINCTES.	131
FIGURE 30 : EVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN ACIDE PROPIONIQUE EXOCELLULAIRE, EN POTASSIUM ET EN MAGNESIUM INTRACELLULAIRES SUITE AUX DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE.....	133
FIGURE 31 : EVOLUTION DES TENEURS INTRACELLULAIRES EN TREHALOSE ET GLYCOGENE SUITE AUX DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE INDIQUES PAR DES FLECHES.	134
FIGURE 32 : VITESSES SPECIFIQUES DE RESPIRATION REELLES ET THEORIQUES SUITE A UN PREMIER PULSE D'ACIDE POUR DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE. A : PH 4, $\mu = 0,1\text{ h}^{-1}$ ET B : PH 5 ET $\mu = 0,05\text{ h}^{-1}$	139
FIGURE 33 : DYNAMIQUES DE RESPIRATION HORS REACTEUR SUR MILIEU SALIN PH 5 (A) ET SUR MILIEU A FORTE PRESSION OSMOTIQUE PH 6,3 (B) SUITE A UN PULSE D'ACIDE PROPIONIQUE POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS.	147
FIGURE 34 : EFFETS COUPLES DU PH ET DE L'ACIDE PROPIONIQUE SUR LA RESPIRATION HORS REACTEUR SUR MILIEU SALIN POUR DES CELLULES PRELEVEES A UN TAUX DE CROISSANCE DE $0,1\text{ h}^{-1}$ ET A UN PH DE 5.	148
FIGURE 35 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN ETHANOL LORS DU TEST DE CAPACITE FERMENTAIRE EN PRESENCE ET EN ABSENCE D'ACIDE PROPIONIQUE.....	150
FIGURE 36 : EVOLUTION DE LA VITESSE SPECIFIQUE DE CONSOMMATION D'OXYGENE DANS LE REACTEUR, DE LA PRODUCTION D'ETHANOL TEST TEMOIN ET TEST EN PRESENCE D'ACIDE PROPIONIQUE SUR LA CULTURE PH 5 ET $\mu = 0,05\text{ h}^{-1}$	151
FIGURE 37 : DYNAMIQUE DE REPONSE A UN PULSE SUIVI D'UN DEBIT CONSTANT D'ACIDE PROPIONIQUE. A : EVOLUTION DES VITESSES SPECIFIQUES DE CONSOMMATION D'OXYGENE REELLE ET THEORIQUE ET DES CONCENTRATIONS INTRACELLULAIRES EN POTASSIUM ET MAGNESIUM. B : EVOLUTION DES SUCRES DE RESERVES. LE PULSE D'ACIDE, LA MISE EN MARCHE DU DEBIT CONSTANT ET SON ARRET SON INDIQUES PAR LES FLECHES. CULTURE REALISEE A PH 5 ET $\mu = 0,1\text{ h}^{-1}$	153
FIGURE 38 : EVOLUTION DE LA VITESSE SPECIFIQUE DE CONSOMMATION D'OXYGENE DANS LE REACTEUR ET DE LA PRODUCTION D'ETHANOL HORS REACTEUR EN ABSENCE ET EN PRESENCE D'ACIDE PROPIONIQUE ET DE LA CONCENTRATION EN ACIDE PROPIONIQUE SUR LA CULTURE PH 5 ET $\mu = 0,1\text{ h}^{-1}$	154
FIGURE 39 : DEBIT DE GLUCOSE ET CONCENTRATION EXOCELLULAIRE EN IONS AMMONIUM AU COURS D'UNE CULTURE EN CONDITION DE CARENCE AZOTE..	161
FIGURE 40 : EVOLUTION DES VITESSES SPECIFIQUES DE CONSOMMATION D'OXYGENE THEORIQUE ET REELLE SUITE A DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE INDIQUES PAR DES FLECHES EN CONDITION DE CARENCE AZOTEE. A : REPONSE AUX DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE. B : DIFFERENTES PHASES DE LA RESPIRATION SUITE AU PREMIER PULSE D'ACIDE PROPIONIQUE..	162
FIGURE 41 : EVOLUTION DU COEFFICIENT RESPIRATOIRE, DE LA CONCENTRATION EXOCELLULAIRE EN ACIDE PROPIONIQUE ET DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN POTASSIUM SUITE A DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE INDIQUES PAR LES FLECHES, EN CONDITION DE CARENCE AZOTEE.	163
FIGURE 42 : DYNAMIQUE DES TENEURS INTRACELLULAIRES EN TREHALOSE ET GLYCOGENE EN CONDITION DE CARENCE AZOTE SUITE A DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE..	165
FIGURE 43 : VITESSE SPECIFIQUE DE RESPIRATION ET CAPACITE FERMENTAIRE EN ABSENCE ET EN PRESENCE D'ACIDE POUR LA CULTURE EN CARENCE AZOTEE.	167
FIGURE 44 : EVOLUTION DU COEFFICIENT RESPIRATOIRE ET DE LA R_{O_2} POUR LA CULTURE EN METABOLISME MIXTE.	172
FIGURE 45 : CARACTERISATION DE LA REPONSE BIOLOGIQUE A DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE EN METABOLISME OXYDO-REDUCTIF, A PH 5. AVEC EN A : CONDUITE DE LA CULTURE, B : CO-METABOLITES ET ACIDE PROPIONIQUE, C : VITESSES SPECIFIQUES ET CONCENTRATION EN ACIDE SUCCINIQUE..	174

FIGURE 46 : EVOLUTION DES VARIABLES POUR UNE CULTURE EN METABOLISME OXYDO-REDUCTIF. A : CONCENTRATIONS EN ACIDE PROPIONIQUE ET EN ETHANOL EXOCELLULAIRES. B : POTASSIUM ET MAGNESIUM INTRACELLULAIRES. C : TENEURS EN TREHALOSE ET GLYCOGENE. D : CAPACITE FERMENTAIRE HORS LIGNE.....	178
FIGURE 47 : BY-PASS DE LA PYRUVATE DESHYDROGENASE (PDH). CETTE VOIE METABOLIQUE PERMET DE CONTOURNER LA PDH ET DE PRODUIRE DE L'ACETYL-CoA CYTOSOLIQUE.....	180
FIGURE 48 : DYNAMIQUE DE LA CONCENTRATION EN ACIDE PROPIONIQUE EXOCELLULAIRE, DU pH_i ET DU FACTEUR D'ACCUMULATION SUR LES PHASES 3 ET 4 DE LA CULTURE EN METABOLISME MIXTE..	182
FIGURE 49 : DYNAMIQUE DES CONCENTRATIONS EXOCELLULAIRES EN ACIDE ACETIQUE ET EN ACIDE PROPIONIQUE SUITE AU DEUXIEME PULSE D'ACIDE PROPIONIQUE EN METABOLISME MIXTE.....	183
FIGURE 50 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE ET DU DEBIT DE GLUCOSE SELON DIFFERENTES LES PHASES D'UNE CULTURE EN MODE OXYDATIF, A pH 5 ET A μ DE $0,1\ h^{-1}$. LES FLECHES INDIQUENT LES PULSES D'ACIDE SORBIQUE.	191
FIGURE 51 : DYNAMIQUE DE LA REPONSE A DEUX PULSES SUCCESSIFS D'ACIDE SORBIQUE SUR DES LEVURES EN MODE OXYDATIF A pH 5 ET μ $0,1\ h^{-1}$. A : EVOLUTION DES VITESSES SPECIFIQUES DE RESPIRATION REELLE ET THEORIQUE ET DU QR. B : CONCENTRATIONS EN ACIDE SORBIQUE, ETHANOL ET ACIDE ACETIQUE AU COURS DU TEMPS.....	192
FIGURE 52 : EVOLUTION DES TENEURS INTRACELLULAIRES EN CATIONS SUITE A DEUX PULSES SUCCESSIFS D'ACIDE SORBIQUE (INDIQUES PAR LES FLECHES) POUR DES CONDITIONS OXYDATIVES DE CROISSANCE A pH 5 ET μ DE $0,1\ h^{-1}$	194
FIGURE 53 : EVOLUTION DU pH_i , DE F ET DE Q_{O_2} SUITE A DEUX PULSES D'ACIDE SORBIQUE EN METABOLISME OXYDATIF, pH 5 ET μ $0,1\ h^{-1}$..	195
FIGURE 54 : DETAIL DES OSCILLATIONS DE LA RESPIRATION ET DE LA CONCENTRATION EN ACIDE SORBIQUE EXOCELLULAIRE SUITE A UN PULSE D'ACIDE SORBIQUE, POUR DES CONDITIONS DE CULTURE DE pH 5 ET μ $0,1\ h^{-1}$	196
FIGURE 55 : DYNAMIQUE DES SUCRES DE RESERVES SUITE A DEUX PULSES SUCCESSIFS D'ACIDE SORBIQUE POUR DES CONDITIONS OXYDATIVES DE CROISSANCE A pH 5 ET μ $0,1\ h^{-1}$. LES PULSES D'ACIDE SONT INDIQUES PAR LES FLECHES.	198
FIGURE 56 : VITESSE SPECIFIQUE DE RESPIRATION ET CAPACITE FERMENTAIRE EN ABSENCE ET EN PRESENCE D'ACIDE POUR UNE CULTURE EN METABOLISME OXYDATIF A pH 5 ET μ DE $0,1\ h^{-1}$, SUITE A DEUX PULSES D'ACIDE SORBIQUE..	198
FIGURE 57 : STRUCTURE DU MODELE COMPARTIMENTE	200
FIGURE 58 : EVOLUTION DES DIFFERENTES VARIABLES SELON LE MODELE DEVELOPPE LORS DE CETTE ETUDE.	201
FIGURE 59 : SCHEMA DES EQUILIBRES DES DIFFERENTES FORMES DU CO_2 ENTRE LE MILIEU EXTERIEUR ET LE CYTOSOL.	202
FIGURE 60 : DYNAMIQUE DES DIFFERENTS EQUILIBRES DU CO_2 SUITE A UNE AUGMENTATION DE PRESSION	203
FIGURE 61 : CONDUITE DE LA CULTURE AVEC DEUX AUGMENTATIONS DE PRESSION DANS LE REACTEUR.....	204
FIGURE 62 : EVOLUTION EN A : DE LA Q_{O_2} REELLE, DE LA Q_{O_2} THEORIQUE ET EN B DE LA PRESSION PARTIELLE EN CO_2 ET DU QR SUITE A DEUX AUGMENTATIONS DE PRESSION DANS LE REACTEUR.	205
FIGURE 63 : EXEMPLE DE REPRESENTATION GRAPHIQUE OBTENUE POUR LA CLASSIFICATION SUPERVISEE DES GENES ASCENDANTE HIERARCHIQUE AVEC L'APPLICATION MATLAB (AMPLITUDE D'EXPRESSION EN FONCTION DU TEMPS).....	223
FIGURE 64 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS TRAITEMENTS ET DE LA DEMARCHE APPLIQUES AUX ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES.	224
FIGURE 65 : PRELEVEMENTS EFFECTUES POUR L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE, Q_{O_2} REELLE ET NOMBRES DE GENES SOUS ET SUREXPRIMES CONCERNANT LA CULTURE DE REFERENCE AVEC L'ECHANTILLON 1 PRIS COMME REFERENCE..	228
FIGURE 66 : REPARTITION FONCTIONNELLE DES GENES SUBISSANT UNE VARIATION D'EXPRESSION INSTANTANEMENT (5 MIN) AU PULSE D'ACIDE PROPIONIQUE POUR LA CULTURE DE REFERENCE.	229
FIGURE 67 : REPARTITION FONCTIONNELLE DES GENES SUBISSANT UNE VARIATION D'EXPRESSION LORS DE L'ANALYSE DE LA CINETIQUE SUITE AU PULSE D'ACIDE PROPIONIQUE POUR LA CULTURE DE REFERENCE.....	231
FIGURE 68 : CINETIQUE DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES PRINCIPALES ENZYMES DU CYCLE DE KREBS VERSUS L'EXPRESSION DE LA REFERENCE.	232
FIGURE 69 : PROFILS D'EXPRESSION DES GENES DANS LES DIFFERENTES CLASSES APRES TRAITEMENT SOUS L'APPLICATION MATLAB..	233
FIGURE 70 : REPARTITION FONCTIONNELLE DES GENES SUBISSANT UNE VARIATION D'EXPRESSION LORS DE L'ANALYSE CINETIQUE SUITE AU PULSE D'ACIDE SORBIQUE POUR LA CULTURE A pH 5 ET μ DE $0,1\ h^{-1}$	243
FIGURE 71 : PROFILS D'EXPRESSION DANS LES DIFFERENTES CLASSES APRES TRAITEMENT SOUS L'APPLICATION MATLAB.	244

Table des tableaux

TABEAU 1 : COMPOSITION MACROMOLECULAIRE DE LA LEVURE <i>S. CEREVISIAE</i> GENERALEMENT ADMISE.	26
TABEAU 2 : CONCENTRATIONS MINIMALES EN AGENTS CONSERVATEURS (MIC) REQUISES POUR INHIBER LA CROISSANCE DES LEVURES A DES PH VOISINS DE 5.	41
TABEAU 3 : COMPOSITION DU MILIEU RICHE UTILISE LORS DES PRECULTURES POUR 1 LITRE DE MILIEU.	73
TABEAU 4 : MILIEU SALIN INITIAL POUR 1 L DE MILIEU.	74
TABEAU 5 : COMPOSITION D'UN LITRE DE MILIEU SALIN D'ALIMENTATION.	74
TABEAU 6 : COMPOSITION D'UN LITRE DE SOLUTION DE VITAMINES CONCENTREE 1000 X.	75
TABEAU 7 : VALEURS DES RENDEMENTS DE CONVERSION DES ELEMENTS EN BIOMASSE	105
TABEAU 8 : DEMANDE NUTRITIONNELLE EN VITAMINES DE LA LEVURE <i>S. CEREVISIAE</i> ET APPORT REALISE AVEC LA SOLUTION DE VITAMINES POUR UN AJOUT TOUTS LES 20 G.L ⁻¹ DE BIOMASSE FORMES.	108
TABEAU 9 : COMPOSITION DU NOUVEAU MILIEU SALIN D'ALIMENTATION.	108
TABEAU 10 : COMPOSITION ELEMENTAIRE MOYENNE DE LA BIOMASSE POUR UN ETAT PHYSIOLOGIQUE DONNE ET STABILISE, MASSE DE LA CMOL, DEGRE DE REDUCTION, POURCENTAGE DE CENDRES ET ECART-TYPE SUR CHAQUE ELEMENT.	110
TABEAU 11 : VALEURS DES DIFFERENTS RENDEMENTS GLOBAUX BRUTS DE CONVERSION DU SUBSTRAT EN CMOL.CMOL ⁻¹ OBTENUS POUR UN REGIME OXYDATIF, A PH 5, A $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$	111
TABEAU 12 : VALEURS DES FACTEURS D'ACCUMULATION THEORIQUES CALCULES POUR UN PH CYTOPLASMIQUE DE 7 ET POUR DEUX PH EXOCELLULAIRES DIFFERENTS POUR PLUSIEURS ACIDES FAIBLES.	122
TABEAU 13 : BILAN SUR LES QUANTITES D'ACIDE PROPIONIQUE INTRODUITES DANS LE MILIEU, RECUPEREES DANS LE SURNAGEANT ET DANS LES CELLULES POUR DEUX LAVAGES SUCCESSIFS DES CELLULES DANS UNE SOLUTION FORTEMENT BASIQUE.	123
TABEAU 14 : BILANS CARBONE ET REDOX PENDANT LA PERIODE D'UN PREMIER PULSE D'ACIDE PROPIONIQUE POUR UN TAUX DE CROISSANCE DE $0,1 \text{ h}^{-1}$ ET UN PH DE 5.	130
TABEAU 15 : RECAPITULATIF DES EVOLUTIONS DES METABOLITES INTRACELLULAIRES SUITE AUX DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE POUR LES DIFFERENTES PHASES DE RESPIRATION.	135
TABEAU 16 : BILAN CARBONE ET REDOX LES DIFFERENTES PHASES QUI SUIVENT UN PREMIER PULSE D'ACIDE PROPIONIQUE POUR UN TAUX DE CROISSANCE DE $0,1 \text{ h}^{-1}$ ET UN PH DE 5.	136
TABEAU 17 : CONDITIONS DE CULTURES : PH, TAUX DE CROISSANCE ET CONCENTRATIONS D'ACIDE INJECTEES POUR LES DEUX PULSES SUCCESSIFS.	137
TABEAU 18 : CONCENTRATIONS EN ACIDE PROPIONIQUE INTRACELLULAIRE, FACTEURS D'ACCUMULATION, pH_i , $Y_{Acide,ATP}^*$ ET VITESSES SPECIFIQUES DE CONSOMMATION D'ACIDE PROPIONIQUE SELON LES DIFFERENTES CONDITIONS REALISEES, SUITE AUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE.	140
TABEAU 19 : CONDITIONS DES TESTS DE RESPIROMETRIE.	146
TABEAU 20 : RENDEMENTS DE CONVERSION DU SUBSTRAT EN CO ₂ ET EN RESERVES PENDANT LA PHASE DE CARENCE AZOTE.	161
TABEAU 21 : CONCENTRATIONS EN ACIDE INTRACELLULAIRE, FACTEURS D'ACCUMULATION, pH_i ET $Y_{ATP,acide}^*$ SUITE AUX DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE DE 6,7 MM EN CARENCE AZOTEE.	164
TABEAU 22 : VALEURS DES RENDEMENTS BRUTS DE CONVERSION DU SUBSTRAT POUR UN METABOLISME RESPIRO-FERMENTAIRE.	173
TABEAU 23 : CONCENTRATIONS D'ACIDE PROPIONIQUE INJECTEES, INTRACELLULAIRES, FACTEURS D'ACCUMULATION ET PH INTRACELLULAIRES EN CONDITION DE LIMITATION D'OXYGENE.	175
TABEAU 24 : CONCENTRATIONS EN ACIDE SORBIQUE INTRACELLULAIRE, FACTEUR D'ACCUMULATION, pH_i ET SUITE AUX DEUX PULSES D'ACIDE SORBIQUE (1,8 MM) POUR UN REGIME OXYDATIF A PH 5 ET $\mu 0,1 \text{ h}^{-1}$	194
TABEAU 25 : RECAPITULATIF DU NOMBRE DE GENES SOUS ET SUREXPRIMES POUR DIFFERENTS PRELEVEMENTS SUITE A DEUX PULSES D'ACIDE PROPIONIQUE POUR LA CULTURE DE REFERENCE.	226

TABEAU 26 : LISTE DES GENES COMMUNS ENTRE LES PRELEVEMENTS 2 ET 4 AVEC LEUR RATIO D'EXPRESSION PAR RAPPORT A LA REFERENCE, LEUR FONCTION ET LEUR CATEGORIE FONCTIONNELLE.	227
TABEAU 27 : NOMBRE DE GENES DONT L'EXPRESSION VARIE SUITE A UN PULSE D'ACIDE PROPIONIQUE EN CARENCE AZOTEE ET SUITE A UN PULSE D'ACIDE SORBIQUE EN METABOLISME OXYDATIF PUR.	227
TABEAU 28 : REPARTITION DES GENES, DES CATEGORIES FONCTIONNELLES, DES LOCALISATIONS ET DU SEUIL DE CONFIANCE DE SIMILITUDE RESPECTIF χ^2_{seuil} POUR LES DIFFERENTES CLASSES (ACIDE PROPIONIQUE).	233
TABEAU 29 : DESCRIPTION DES DIFFERENTES CATEGORIES FONCTIONNELLES DEFINIES PAR LA BASE DE DONNEES MIPS.....	234
TABEAU 30 : REPRESENTATIVITE DE CHAQUE CATEGORIE FONCTIONNELLE POUR CHAQUE CLASSE ET POUR LE GENOME COMPLET.	235
TABEAU 31 : VALEURS DU CRITERE P^{repr} POUR LES CATEGORIES FONCTIONNELLE SIGNIFICATIVEMENT SUR ET SOUS REPRESENTES POUR CHACUNE DES CLASSES CINETIQUES (ACIDE PROPIONIQUE).....	237
TABEAU 32 : FREQUENCE D'APPARITION D'UNE LOCALISATION POUR CHAQUE CLASSE ET DANS LE GENOME COMPLET.	238
TABEAU 33 : VALEURS DU CRITERE P^{repr} POUR LES LOCALISATIONS CELLULAIRES SIGNIFICATIVEMENT SUR ET SOUS REPRESENTES POUR CHACUNE DES CLASSES CINETIQUES (ACIDE PROPIONIQUE).....	239
TABEAU 34 : RECOUPEMENT DES LOCALISATIONS ET CATEGORIES FONCTIONNELLES SOULIGNEES PAR LE TEST DU KHI DEUX POUR CHAQUE CLASSE.....	239
TABEAU 35 : MATRICE DE CORRELATION ENTRE LES VARIABLES MACROSCOPIQUES ET LES DIFFERENTES CLASSES, OBTENUE PAR TRAITEMENT DES DONNEES SOUS UNE APPLICATION MATLAB.	240
TABEAU 36 : REPARTITION DES GENES, DE CATEGORIES FONCTIONNELLES, LOCALISATIONS ET DU SEUIL DE CONFIANCE DE SIMILITUDE RESPECTIF χ^2_{seuil} POUR LES DIFFERENTES CLASSES (ACIDE SORBIQUE).	244
TABEAU 37 : REPRESENTATIVITE DE CHAQUE CATEGORIE FONCTIONNELLE POUR CHAQUE CLASSE ET POUR LE GENOME COMPLET.	245
TABEAU 38 : VALEURS DU CRITERE P^{repr} POUR LES CATEGORIES FONCTIONNELLES SIGNIFICATIVEMENT SUR ET SOUS REPRESENTES POUR CHACUNE DES CLASSES CINETIQUES (ACIDE SORBIQUE).....	245
TABEAU 39 : FREQUENCE D'APPARITION D'UNE LOCALISATION POUR CHAQUE CLASSE ET DANS LE GENOME COMPLET.	246
TABEAU 40 : VALEURS DU CRITERE P^{repr} POUR LES LOCALISATIONS CELLULAIRES SIGNIFICATIVEMENT SUR ET SOUS REPRESENTES POUR CHACUNE DES CLASSES CINETIQUES (ACIDE SORBIQUE).....	246
TABEAU 41 : RECOUPEMENT DES LOCALISATIONS ET CATEGORIES FONCTIONNELLES SOULIGNEES PAR LE TEST DU KHI DEUX POUR CHAQUE CLASSE.....	247
TABEAU 42 : GENES COMMUNS AUX CINETIQUES DE STRESS A L'ACIDE PROPIONIQUE ET SORBIQUE, L'EXPRESSION DANS LES TROIS PRELEVEMENTS (5, 60 ET 205 MINUTES APRES LE PULSE D'ACIDE) EST REPRESENTEE PAR 0 POUR AUCUNE VARIATION, - POUR UNE SOUS EXPRESSION ET + POUR UNE SUREXPRESSION, LES GENES APPARAISSANT GRISES SUBISSENT DES VARIATIONS IDENTIQUES.....	248

Introduction

Contexte de l'étude

Les levures

La panification et la vinification sont reportées dès 6000 ans avant Jésus Christ chez les Sumériens et les Babyloniens ce qui fait de *Saccharomyces cerevisiae* le premier micro-organisme utilisé par l'homme. Plus près de nous, bien que A. Von Leeuwenhoek (1632-1723) fut le premier à observer des cellules de levure, l'abbé Lazzaro Spallanzani (1729-1799) a été le premier « microbiologiste » à cultiver des microbes en utilisant un milieu nutritif. L'identification de l'origine biologique du processus de fermentation est l'œuvre d'un physicien chimiste français, Louis Pasteur au XIX^{ème} siècle. Ainsi le développement de la microbiologie sur ces bases scientifiques a abouti à la rationalisation de la production et à l'utilisation des levures dans une dimension industrielle. De nos jours, en agroalimentaire, elles interviennent dans la fabrication du vin, de la bière, du saké et du pain. Dans la dernière décennie du XX^{ème} siècle, la production mondiale de levures est de 2,5 millions de tonnes par an avec l'Europe et l'Amérique du Nord comme principaux producteurs.

Outre un rôle historique dans le secteur agroalimentaire, la levure a été retenue pour des études de génétique au cours des années 1930 pour s'imposer finalement au cours des années 1970-1980 comme le modèle majeur de la cellule eucaryote inférieure en biologie moléculaire et cellulaire. Une des grandes étapes techniques pour la compréhension du vivant restera peut-être le séquençage complet d'un génome eucaryote, celui de *S. cerevisiae* (Goffeau et coll., 1996) qui confère à ce micro-organisme les atouts considérables pour des études tant fondamentales qu'appliquées. Cette séquence composée de 12 millions de paires de bases a révélé environ 6000 gènes dont 25 % sont encore de fonction inconnue et a ouvert l'ère à la post-génomique. La biologie a alors vu se développer de nouvelles approches utilisant une batterie de techniques d'analyses ciblées ou aléatoires pour examiner l'ensemble du génome.

Intéressante de par son statut de micro-organisme GRAS (Generally Regarded As Safe), *S. cerevisiae* est essentiellement exploitée avec deux objectifs principaux, à savoir la production de métabolites et la production de biomasse. Ainsi, les levures sont désormais utilisées dans de nombreux secteurs de la recherche biomédicale et des biotechnologies. Elles sont devenues un outil biotechnologique pour la production de protéines d'intérêt commercial, un outil de criblage de nouveaux médicaments et un des principaux modèles cellulaires eucaryotes inférieurs en recherche fondamentale du fait de la performance des outils de biologie moléculaire et cellulaire qui ont été développés. Néanmoins, au-delà de la biologie moléculaire, la microbiologie et l'ingénierie biotechnologique sont indispensables pour des productions à grande échelle.

Contexte de l'étude

De tout temps, des moyens physiques ont été utilisés pour prolonger la durée de conservation des denrées alimentaires : cuisson et atténuation de l'activité de l'eau par dissécation ou salage. De nouvelles méthodes d'irradiation et de traitement par haute pression ont en outre été développées. D'autres procédés technologiques, comme la macération dans des acides, le fumage et l'apport d'épices favorisent également la conservation des denrées alimentaires. Lorsque les méthodes physiques ne peuvent pas être utilisées ou ne permettent pas à elles seules d'obtenir le résultat escompté, des agents conservateurs chimiques sont alors utilisés. Ainsi, dans l'industrie agroalimentaire, les différents agents conservateurs employés sont les suivants : les sulfites (conservation du vin), l'acide acétique (marinades), l'acide propionique (pain), l'acide sorbique (boissons gazeuses) et l'acide benzoïque (boissons gazeuses). Ces agents conservateurs sont un moyen indispensable pour limiter la croissance microbienne dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires sans en changer le goût, l'arôme et la texture. Le nombre de composés chimiques pouvant être utilisés comme conservateurs dans ces différents domaines est limité suite à une toxicité potentielle pour les consommateurs et sont soumis à des restrictions au niveau de leur utilisation et de leur concentration.

Ces agents conservateurs, bloquant le développement de micro-organismes indésirables, ont de par nature le même effet sur les levures, et provoquent une réduction notable du pouvoir fermentaire de la levure, donc de la levée de la pâte. En effet, il est décrit dans la littérature différents mécanismes induits par les acides faibles sur les levures. Parmi les différents effets reportés, leur implication contribuerait à :

- l'acidification cytosolique et par-là même leur effet négatif sur l'énergétique cellulaire corrélée à un accroissement de la respiration,
- l'accumulation intracellulaire de cations et d'acides carboxyliques,
- la réponse au stress thermique et à la thermotolérance de la levure,
- la réduction de l'activité glycolytique et à l'induction de voies cataboliques spécifiques de certains acides.

Cependant, une première exposition à une concentration non létale d'un acide faible non synthétisé par la levure permettrait de réduire voire de prévenir toute inhibition de l'activité cellulaire lors d'une exposition ultérieure. Ce mécanisme appelé « adaptation » de la levure reste encore mal connu et donc mal maîtrisé. En revanche, les études sur l'action des acides faibles sur la physiologie cellulaire, et en particulier sur l'énergétique de la levure ont fourni une abondante littérature sur les différentes

réponses métaboliques induites. Sur la problématique spécifique de l'« adaptation », les travaux paraissent se focaliser sur la recherche d'un facteur unique apte à élucider ce mécanisme. Ainsi, il a été avancé qu'une première exposition à un acide induit l'expression de plusieurs protéines membranaires qui permettent d'exporter l'acide sous sa forme dissociée et d'activer l'expulsion de protons hors de la cellule. Toutefois, la transposition de ces conclusions à la production industrielle d'une levure performante a révélé des comportements particuliers, sinon singuliers, qui appellent à une meilleure connaissance des mécanismes biologiques pouvant participer à l'obtention d'un état d'« adaptation ».

Objectifs et Stratégie

Dans le cadre de cette problématique, l'un des premiers critères était d'identifier les conditions opératoires et les cibles d'études qui semblaient les plus pertinentes pour la compréhension des mécanismes biologiques impliqués. Afin d'être en adéquation avec une démarche d'application industrielle, la stratégie d'investigation a été définie pour des cultures à hautes concentrations cellulaires, sur l'étude de la réponse dynamique à des perturbations environnementales par un effecteur acide. Avec ces exigences, la mise en œuvre de cultures discontinues alimentées permet le contrôle de différents états physiologiques stabilisés et, de par leur très forte réactivité, la prise en compte des interactions dynamiques maîtrisées entre l'environnement et le système biologique.

En ce sens, les études ont été menées avec pour objectifs, d'une part la validation de l'approche expérimentale et des conditions opératoires transposables industriellement et d'autre part, la compréhension des mécanismes participant à l'homéostasie cellulaire chez la levure dans la réponse à un stress imposé par un acide faible.

Il s'agissait dans un premier temps de déterminer la conduite des cultures satisfaisant aux demandes nutritionnelles, aux transferts de masse et de chaleur afin de définir le domaine d'étude. De même, sur la base des temps de relaxation des mécanismes suspectés, le filtrage et la correction des mesures brutes ainsi que les techniques d'échantillonnage devaient être affinées pour la quantification cinétique des variables d'état biotiques et abiotiques.

Aucune référence bibliographique n'étant disponible pour orienter l'étude selon nos choix méthodologiques, nous avons défini un référentiel par la caractérisation cinétique la plus approfondie possible de la réponse à une exposition à un acide métabolisable en mode purement oxydatif : l'acide propionique.

Dans un deuxième temps, les études réalisées en métabolisme oxydo-réductif ou en carence azotée avaient pour but la caractérisation de la réponse homéostatique à un acide par le contrôle exogène ou intrinsèque du potentiel énergétique cellulaire.

Les études comparatives avec comme effecteur l'acide sorbique et le dioxyde de carbone devraient nous aider à caractériser les événements communs à la fonction acide et les spécificités liées à la molécule inductrice.

Parallèlement à cette étude, nous avons souhaité pouvoir introduire des informations complémentaires pouvant rendre compte de la réponse transcriptomique aux différentes modifications environnementales. Sur la base de l'analyse dynamique de l'expression des ARN transcrits, l'objectif de cette approche était d'évaluer la faisabilité d'une analyse intégrant à la fois les données macroscopiques et transcriptomiques afin de dégager certaines hypothèses sur l'identification des fonctionnalités cellulaires mobilisées.

Présentation du mémoire

La première partie de ce mémoire (**Etude Bibliographique**) reprend dans un premier temps les connaissances acquises sur la physiologie de la levure de boulangerie, puis traite de l'effet de différents acides faibles sur *S. cerevisiae* autant au niveau physiologique qu'au niveau transcriptomique.

La deuxième partie du manuscrit (**Matériel et Méthodes**) détaille les milieux de culture utilisés, les conditions de culture, les techniques analytiques et traitements mathématiques utilisées ou mis au point pour accomplir ce travail.

La troisième partie du manuscrit correspond aux **Résultats et Discussion**, divisés en 6 chapitres principaux. Le *chapitre I* définit les conditions de travail mises en place et les différents calculs et hypothèses utilisés. Le *chapitre II* est focalisé sur la réponse de la levure à l'acide propionique pour différentes conditions de culture, en mode oxydatif, en tenant compte de tous les effecteurs mis en jeu par la levure. Nous nous sommes arrêtés sur les capacités fermentaire et respiratoire de *S. cerevisiae* en présence de ce même acide. Le *chapitre III* a pour but de déterminer l'implication de l'énergétique cellulaire dans la réponse à l'acide propionique en réacteur mais aussi au niveau de la capacité fermentaire mesurée hors ligne. Dans le chapitre IV, nous avons voulu caractériser la réponse de la levure à deux effecteurs acides, un non métabolisé et l'autre généré par la levure. Le *chapitre V* est une analyse générale des résultats macrocinétiques et cellulaires obtenus dans les précédents chapitres. Enfin, le *chapitre VI* présente une analyse transcriptomique réalisée pour différentes conditions de culture avec pour but principal de réconcilier les données macroscopiques et les données transcriptomiques.

La quatrième partie du mémoire concerne les **conclusions générales** et les **perspectives** pour poursuivre les travaux de la thèse en terme de travaux à effectuer pour valider nos résultats et des méthodologies nouvelles à mettre en place.

Les études qui me permettent de présenter cette thèse ont été réalisées dans le cadre d'une convention CIFRE au LBB.

Bonne lecture

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La levure de boulangerie

I.1. Physiologie de la levure

La physiologie des levures se caractérise essentiellement par rapport à leur catabolisme énergétique : oxydatif, fermentaire ou mixte (respiro-fermentaire). Les levures présentent un comportement physiologique différent selon l'espèce, les sources de carbone et d'azote dégradées et les conditions environnementales. L'oxygène et la source de carbone déterminent principalement l'orientation du métabolisme. Toutefois, toutes les levures sont capables de se développer en présence de glucose comme unique source de carbone et d'énergie (Barnett, 1976).

I.1.1. Le métabolisme oxydatif

Le catabolisme oxydatif du glucose consiste en une oxydation complète de la molécule de glucose en eau et en dioxyde de carbone via la glycolyse, le cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative (Figure 1). Les co-enzymes réduits NADH, H^+ et FADH_2 produits dans la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) sont régénérés en NAD^+ et FAD dans la chaîne respiratoire. Ils transfèrent leurs électrons à l'oxygène en libérant de l'énergie ce qui permet d'exporter des protons de la mitochondrie et de maintenir le gradient de protons. L'entrée des protons dans la mitochondrie permet aux ATPases membranaires de phosphoryler l'ADP en ATP (de Vries et Marres, 1987).

Il a toujours été admis que l'oxydation du NADH, H^+ était couplée à la phosphorylation de l'ADP. La compréhension du mécanisme de couplage entre le transfert d'électrons et la synthèse d'ATP est due à P. Mitchell (1961) appelée aussi « théorie chimioosmotique ». Ce mécanisme repose sur trois postulats :

1. La chaîne mitochondriale transfère des protons à travers la membrane pendant que les électrons s'écoulent d'un complexe à l'autre de cette chaîne.
2. La force proton motrice est composée d'un terme chimique (gradient de protons, $\Delta p\text{H}$) et électrique (potentiel membranaire, $\Delta\Psi$). Elle est utilisée pour la synthèse d'ATP grâce à un système enzymatique situé dans la membrane : l'ATP synthase. La force proton motrice peut alors se définir par l'équation suivante :

$$\Delta P = \Delta\Psi - \frac{2,3 \cdot RT}{F} \Delta p\text{H} . \quad \text{Equation 1}$$

avec R, constante des gaz parfaits, T, température et F, constante de Faraday.

3. La membrane est imperméable aux protons. Quand l'intégrité de la membrane n'est plus assurée, aucune force proton motrice ne peut s'établir et la synthèse d'ATP n'est plus possible.

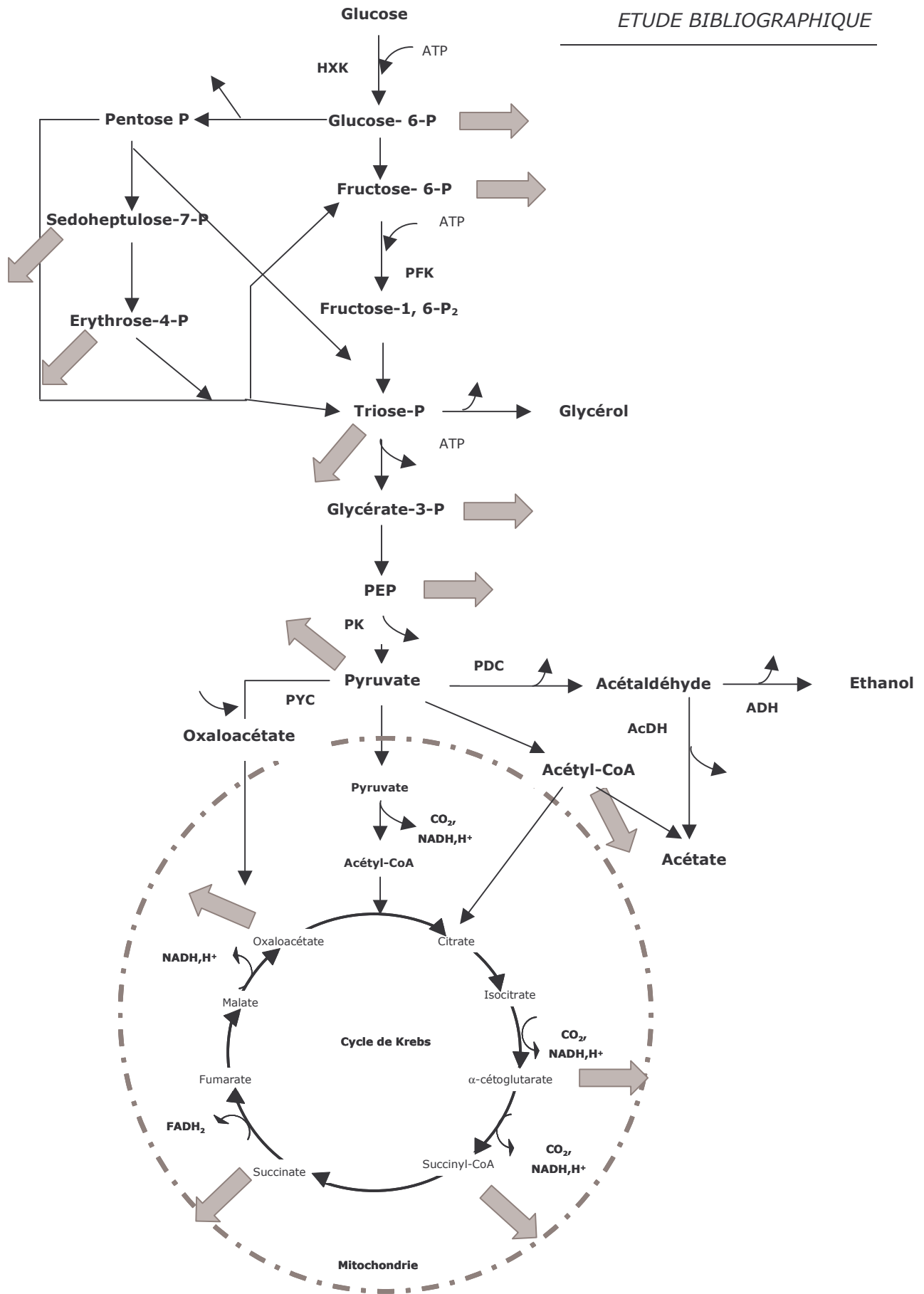
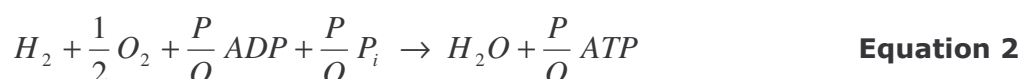


Figure 1 : Glycolyse, cycle de Krebs et fermentation chez *S. cerevisiae*. Les flèches grises indiquent les sorties de précurseurs pour l'anabolisme. HXK : hexokinase, PFK : phosphofructokinase, PK : pyruvate kinase, PYC : pyruvate carboxylase, PDC : pyruvate décarboxylase, ADH : alcool déshydrogénase, AcDH : acétaldéhyde déshydrogénase.

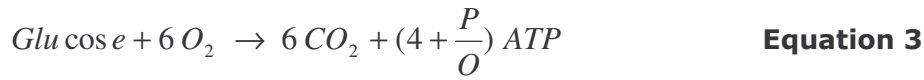
L'efficacité de la chaîne respiratoire est illustrée par le nombre de moles d'ATP formées par atome d'oxygène consommé appelé rapport $\frac{P}{O}$. Ce dernier est variable pour une même espèce en fonction des conditions de culture. Il varie aussi en fonction de l'espèce levurienne considérée du fait de différences de structure de la chaîne respiratoire. Ainsi, des trois sites d'exportation de protons de la chaîne respiratoire, habituellement présents chez les eucaryotes supérieurs et chez la levure *Candida utilis* par exemple, deux seulement sont présents chez *Saccharomyces cerevisiae* (Ohnishi, 1973). La NADH déshydrogénase est située à proximité de la succinate déshydrogénase dans la membrane interne mitochondriale et n'est pas couplée à un site d'exportation de protons, ce qui explique le ratio $\frac{P}{O}$ plus faible obtenu sur les mitochondries isolées de *S. cerevisiae* par rapport à celles de *C. utilis* ($\frac{P}{O}$ de 1,5 et 2 respectivement pour les mitochondries de *S. cerevisiae* et de *C. utilis*, Verduyn et coll., 1991). En outre, le FADH₂ produit dans le cycle de Krebs intègre la chaîne respiratoire après le premier site d'exportation de protons. Pour *S. cerevisiae*, l'oxydation d'une mole de NADH, H⁺ ou de FADH₂ met donc en jeu les mêmes intermédiaires de la chaîne respiratoire et conduit à la formation de la même quantité d'ATP.

La membrane mitochondriale est imperméable aux co-enzymes, ainsi, le NADH, H⁺ libéré par la glycolyse ne peut pas entrer dans la mitochondrie (von Jagow et Klingenberg, 1970 cités par Verduyn et coll., 1991). Cependant une NADH déshydrogénase située sur la surface externe de la membrane mitochondriale permet de régénérer les co-enzymes réduits dans le cytosol en intégrant la chaîne respiratoire au même niveau que le NADH mitochondrial. Ainsi, le rapport $\frac{P}{O}$ n'est pas dépendant de la localisation des équivalents réducteurs dans la cellule de *S. cerevisiae*. Les co-enzymes réduits produisent la même quantité d'ATP par mole d'oxygène consommée indépendamment du co-enzyme considéré et de sa localisation dans la cellule, dans le cytosol (NADH, H⁺) ou dans la mitochondrie (NADH, H⁺ et FADH₂). La stœchiométrie globale de la phosphorylation oxydative est donc donnée par l'équation suivante :



La valeur du rapport $\frac{P}{O}$ est sujette à discussion et est fonction des conditions de croissance et une valeur inférieure à 1,33 est souvent rapporté pour *S. cerevisiae* (Verduyn et coll., 1992a). Quant au NADPH, H⁺ produit dans la voie des pentoses, il est

essentiellement utilisé dans la biosynthèse de précurseurs ou de macromolécules et aucune transhydrogénase n'a été décrite chez la levure (Bruinenberg et coll., 1985). Le bilan énergétique de l'oxydation du glucose est donc le suivant :



L'énergétique cellulaire est généralement évaluée par le terme Y_{ATP} (exprimé en g de cellules formées par moles d'ATP générées) et est dépendant du ratio $\frac{P}{O}$ utilisé. Pour des cultures continues oxydatives et un ratio $\frac{P}{O}$ fixé à 0,95, le Y_{ATP} varie entre 10 et 16 g.mol d'ATP⁻¹ pour des taux de croissance compris entre 0,1 et 0,5 h⁻¹. Lorsque le taux de croissance augmente, le Y_{ATP} diminue et pour un taux de croissance donné, le Y_{ATP} augmente avec le pH de la culture (Verduyn et coll., 1990b, 1992b).

L'anabolisme de la levure comprend les processus cellulaires liés à la synthèse de macromolécules (protéines, lipides, ARN, ADN et polysaccharides) qui composent le matériel cellulaire (Tableau 1). Pendant la croissance de *S. cerevisiae* sur milieu synthétique contenant une seule source de carbone, la totalité du carbone incorporé dans ces polymères provient d'un nombre restreint d'intermédiaires métaboliques générés dans les voies centrales du métabolisme : la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphates (Figure 1). Ces voies représentent l'interface entre catabolisme et anabolisme. Cette phase requiert de l'énergie et des apports d'équivalents réducteurs. En pratique, le rendement de conversion du glucose en biomasse en métabolisme oxydatif est d'environ 0,5 g de biomasse par gramme de glucose et diffère selon la souche considérée (Käppeli, 1986 ; Postma et coll., 1989).

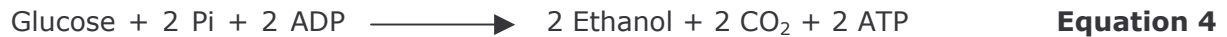
Tableau 1 : Composition macromoléculaire de la levure *S. cerevisiae* généralement admise (Kockova-Kratochvilova, 1990).

Composé	Teneur (% PS)
Protéines	45 à 60
Polysaccharides	25 à 35
Lipides	4 à 7
ADN, ARN	10

I.1.2. Métabolisme fermentaire en anaérobiose

Toutes les levures sont capables de se développer en anaérobiose avec parfois un milieu complémenté en ergostérol ou en Tween 80 (Visser et coll., 1990). Elles doivent pour cela faire face à des problèmes spécifiques dus à l'absence d'oxygène, tels que la production d'énergie et l'équilibre de la balance redox.

Contrairement à l'aérobiose, l'oxygène ne peut pas intervenir comme accepteur final d'électrons et aucun autre type d'accepteur (sulfate, nitrate) n'a été identifié chez la levure (Schulze, 1995). Aussi, tout l'ATP provient de la transformation du substrat en éthanol. Le bilan énergétique de la dégradation du glucose en éthanol est le suivant :



Le rendement de conversion du glucose en éthanol nommé Gay-Lussac est de 0,511 g d'éthanol par g de glucose. En anaérobiose, une partie du substrat est converti en biomasse. Aussi, les rendements pratiques en produit obtenus sont en général de 80 à 90 % du rendement théorique. Le rendement en biomasse est de l'ordre de 0,1 g.g de glucose⁻¹ (Käppeli, 1986 ; Verduyn et coll., 1991). En culture continue anaérobie, le Y_{ATP} diminue de 14 à 11 g de biomasse.mol d'ATP formées⁻¹ quand le taux de croissance augmente de 0,05 à 0,28 h⁻¹ (Verduyn et coll., 1991).

Outre l'éthanol, des produits secondaires sont aussi formés au cours de la fermentation, le plus important étant le glycérol. Son accumulation peut paraître illogique d'un point de vue énergétique puisqu'elle dévie une partie du flux de carbone de la portion de la voie d'EMP productrice d'énergie. Mais sa synthèse s'explique par le déséquilibre que crée l'anabolisme sur la balance redox. En effet, si le NAD⁺ consommé dans la glycolyse est équilibré par celui produit au cours de la réduction finale de l'acétaldéhyde en éthanol, la consommation des intermédiaires pour l'anabolisme déséquilibre la balance en faveur d'une accumulation de NADH,H⁺. La production de glycérol permet donc d'oxyder les co-enzymes réduits et d'équilibrer la balance redox au détriment d'une dissipation d'énergie (Schulze, 1995). Ainsi, le rendement en biomasse au cours d'une culture aérée est plus élevé du fait du surplus d'énergie généré par la respiration (Oura, 1977). Parmi les autres sous-produits, les acides acétique, pyruvique et succinique peuvent être sécrétés. Ils accentuent le déficit de la balance redox et leur production explique une partie de la production de glycérol (Schulze, 1995).

I.1.3. Métabolisme fermentaire en aérobiose

Dans certaines conditions liées à leur environnement, certaines levures sont capables de produire de l'éthanol en présence d'oxygène. Dans ce cas, on observe généralement un métabolisme oxydo-réductif plus qu'un métabolisme fermentaire pur. Plusieurs explications peuvent être données pour la production d'éthanol qui apparaît alors :

- En condition d'excès de substrat, certaines levures répondent par une production d'éthanol ; elles sont dites Crabtree positives (cf. § I.1.4.).

- Une limitation nutritionnelle en oligo-élément(s) ou en vitamine(s) peut limiter, ralentir voire empêcher la conversion du substrat en biomasse et ainsi affecter le taux de croissance (Egli et Fiechter, 1981). Dans le cas des levures, la réduction du taux de croissance peut s'accompagner d'une production d'éthanol utilisée pour dissiper l'excès de substrat.
- En culture continue, Fiechter et coll. (1981) ont mis en évidence chez *S. cerevisiae* un taux de dilution critique correspondant au taux de croissance maximal oxydatif au-delà duquel la levure bascule en métabolisme mixte. Ce taux de croissance critique dépend fortement de la souche utilisée, et la bascule métabolique a lieu entre 0,2 et 0,32 h⁻¹ pour une même souche en fonction du mode opératoire.
- Pour certains auteurs (Barford, 1981 ; Rieger et coll., 1983), la bascule du métabolisme oxydatif au métabolisme oxydo-réductif aurait pour origine une capacité respiratoire limite des micro-organismes (cf. paragraphe I.1.5.).

I.1.4. Effet Crabtree

En culture aérobie, Crabtree remarque que la respiration des cellules tumorales de rat en présence de glucose est anormalement faible comparée à l'activité glycolytique dans leur milieu de croissance (Crabtree, 1929). Ce même phénomène est mis en évidence et étudié chez la levure par Ephrussi en 1956 (cité par Sols et coll., 1971). Cet effet est une réponse fermentaire à des concentrations élevées en sucre (van Urk et coll., 1990).

De façon implicite, deux définitions de l'effet Crabtree sont utilisées par la suite chez la levure : l'une phénoménologique comme étant la production d'éthanol en aérobiose et l'autre mécanistique comme étant l'inhibition de la respiration par la fermentation en condition de non limitation en oxygène (Alexander et Jeffries, 1990).

Le niveau de sensibilité est variable suivant l'espèce de levure considérée (de Decken, 1966). Certaines, comme *S. cerevisiae* sont fortement Crabtree positives et produisent de l'éthanol au-delà d'une concentration résiduelle de glucose de 1 g.L⁻¹, tandis que d'autres ne montrent pas de répression tant que la concentration en glucose ne dépasse pas 20 à 50 g.L⁻¹ (Ratledge, 1991). Celles dont la respiration n'est pas inhibée par la présence du glucose sont dites Crabtree négatives.

En culture continue aérée sur glucose, *S. cerevisiae* présente deux types de métabolismes : oxydatif et oxydo-réductif (ou respiro-fermentaire) en fonction du taux de croissance imposé à la culture par le taux de dilution (Figure 2).

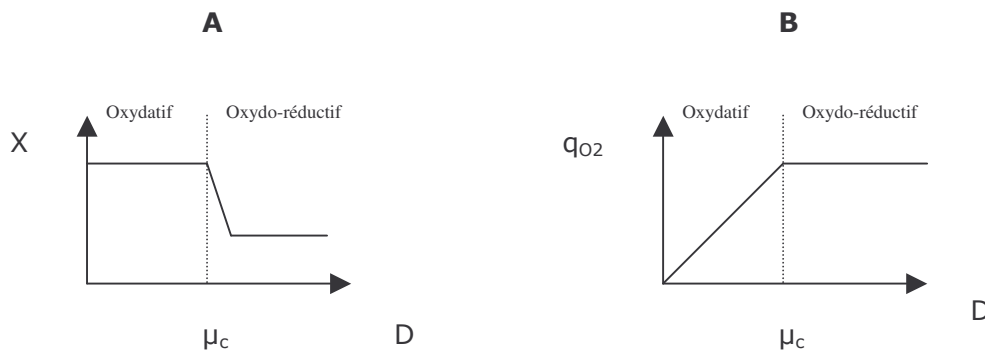


Figure 2 : Schéma du comportement métabolique de *S. cerevisiae* en culture continue aérée en fonction du taux de dilution avec en A la concentration en biomasse et en B la vitesse spécifique de respiration (Barford, 1990).

Lorsque le taux de dilution augmente, la levure est incapable d'oxyder tout le glucose à partir d'un taux de dilution critique (μ_c) correspondant au taux de croissance maximal oxydatif en culture continue. Au-delà, la levure passe en métabolisme mixte (respiro-fermentaire) pour se développer plus rapidement. C'est l'effet Crabtree avec production d'éthanol dans le milieu de culture, inhibition ou limitation du métabolisme oxydatif et dégradation essentiellement fermentaire du glucose.

I.1.5. Capacité respiratoire limite

L'hypothèse d'une capacité respiratoire limite est avancée pour expliquer le comportement de *S. cerevisiae* en culture aérée (Barford, 1981) et est ensuite confirmée par l'étude de la transition métabolique en culture continue au cours du passage du métabolisme oxydatif au métabolisme oxydo-réductif. Ainsi, Rieger et coll. (1983) réalisent des cultures sur mélange éthanol-glucose dans différentes proportions et constatent que la transition métabolique s'effectue à des taux de croissance d'autant plus faibles que la part d'éthanol dans l'alimentation est élevée. Cependant, le taux de croissance critique est atteint dans chaque cas pour une même valeur de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène $q_{O_2} = 8 \text{ mmoles d'O}_2 \cdot \text{g de biomasse}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Sonnleitner et Käppeli (1986) expliquent ces résultats par le goulot d'étranglement respiratoire du métabolisme oxydatif schématisé sur la figure 3. En aérobiose, en croissance oxydative, la capacité respiratoire constitue l'étape limitante de l'oxydation d'une ou plusieurs sources de carbone chez la levure, la capacité respiratoire maximale correspondante est appelée $q_{O_2\max}$. Le flux maximal de glucose pouvant être oxydé correspond au flux critique saturant la respiration. Lorsque le flux de glucose est inférieur au flux critique, un co-métabolite tel que l'éthanol peut être oxydé simultanément, mais le glucose est néanmoins assimilé de façon prioritaire si son flux vient à augmenter. La

production d'éthanol survient lorsque le flux de glucose dépasse cette capacité respiratoire.

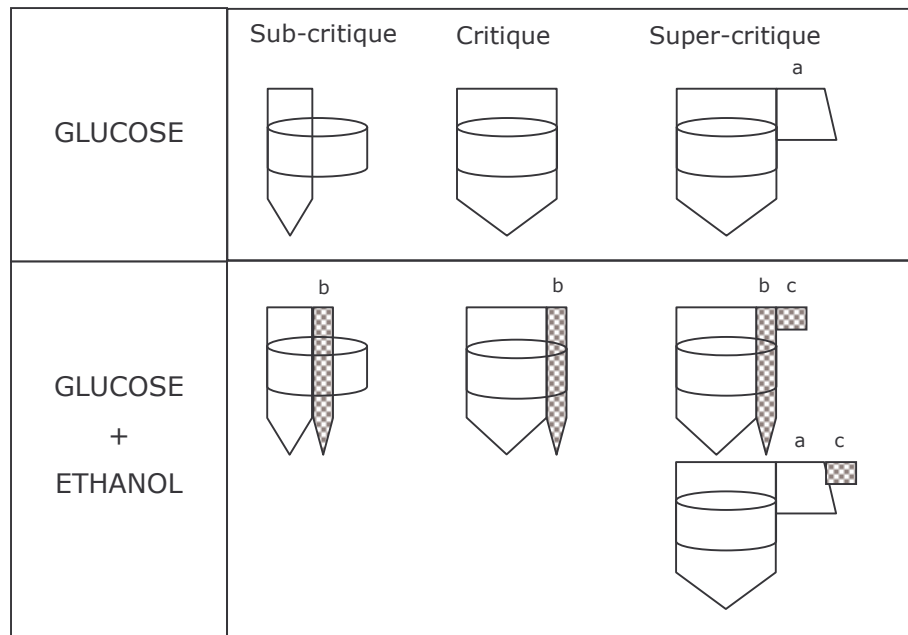


Figure 3 : Capacité respiratoire limite de *S. cerevisiae* avec a : excès de glucose fermenté, b : deuxième substrat consommé, c : deuxième substrat en excès, fermenté (Sonnleitner et Käpelli, 1986).

Cette hypothèse de capacité respiratoire limite est cependant remise en cause par plusieurs études ultérieures :

- Van Urk et coll. (1989) étudient la capacité respiratoire des mitochondries isolées de levures Crabtree positives (*S. cerevisiae*) et Crabtree négatives (*Candida utilis*). Ils ne constatent aucune différence au niveau des capacités respiratoires de ces deux souches et concluent que l'effet Crabtree de *S. cerevisiae* n'est pas dû à un goulot d'étranglement au niveau de la capacité respiratoire.
- L'utilisation d'acides faibles agissant comme découplants de l'énergétique cellulaire permet en outre d'augmenter la respiration cellulaire en chémostat bien au-delà de la valeur maximale q_{O_2max} déterminée à μ_c sur glucose (Postma et coll., 1989, cf. § II.2.1.c.). Ainsi, pour des levures en culture continue sur glucose, avec de l'acide benzoïque dans le bidon d'alimentation (concentration finale de 10 mM), la q_{O_2} mesurée est de $19,5 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, pour une q_{O_2max} mesurée en absence d'acide de $12 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Postma et coll., 1989 ; Verduyn et coll., 1992a).
- Par ailleurs, Guillou (1996) montre que pour des taux de croissance inférieurs à $0,26 \text{ h}^{-1}$, la q_{O_2} mesurée « in situ » est inférieure à la q_{O_2} mesurée hors réacteur ($q_{O_{2out}}$ ou capacité respiratoire) (Figure 4). Le fait que la cellule dispose d'une sorte de marge de potentiel respiratoire à ces taux de croissance n'est pas expliquée pour le moment mais

est corrélée à l'observation de Verduyn et coll. (1992a) qui constatent qu'un effet découplant important intervient sur la respiration dans cette zone de taux de croissance.

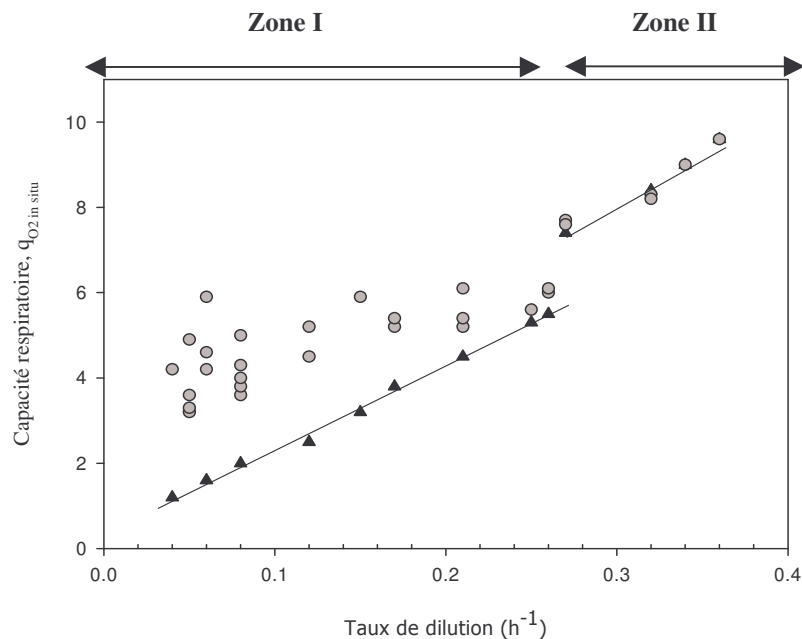


Figure 4 : Evolution de la capacité respiratoire (●) et de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène ($q_{O_2 \text{ in situ}}$, ▲) exprimées $mmol.g$ de biomasse $^{-1}.h^{-1}$. La capacité respiratoire a été déterminée en respiromètre en conditions d'excès de glucose (d'après les travaux de Guillou, 1996).

I.1.6. Réserves en hydrates de carbone

Le tréhalose et le glycogène sont les deux principaux sucres de réserves chez *S. cerevisiae* et peuvent représenter jusqu'à 25 % de la masse sèche cellulaire en conditions d'accumulation. Les niveaux des sucres de réserves dépendent des conditions environnementales et de la phase du cycle cellulaire. Ainsi en croissance exponentielle, ils constituent moins de 1 % de la biomasse totale (Lillie et Pringle, 1980). Par ailleurs, depuis de nombreuses années, il a été montré que la teneur en sucres de réserves chez la levure est fonction du taux de croissance (Kuenzi et Fiechter, 1969). Ce phénomène est parfaitement bien illustré chez la levure *S. cerevisiae* cultivée en régime continu oxydatif où le profil d'accumulation du tréhalose et du glycogène est inversement proportionnel au taux de croissance (Kuenzi et Fiechter, 1972). Les deux sucres sont stockés dans le cytosol lieu de leur synthèse mais aussi de leur dégradation. La synthèse de tréhalose et de glycogène consomme très peu d'énergie et ne s'accompagne d'aucune décarboxylation. Le stockage du tréhalose et du glycogène contribue donc à augmenter la masse cellulaire sans participer à la production globale de CO_2 .

Les voies métaboliques de synthèse et de dégradation sont à présent connues ainsi que la totalité des gènes codant pour les enzymes impliquées dans les voies (Figure

5). Les systèmes de régulation sont quant à eux loin d'être totalement élucidés même si l'AMP cyclique (cAMP) est connu pour être impliqué dans la régulation du métabolisme du tréhalose (Thevelein, 1984).

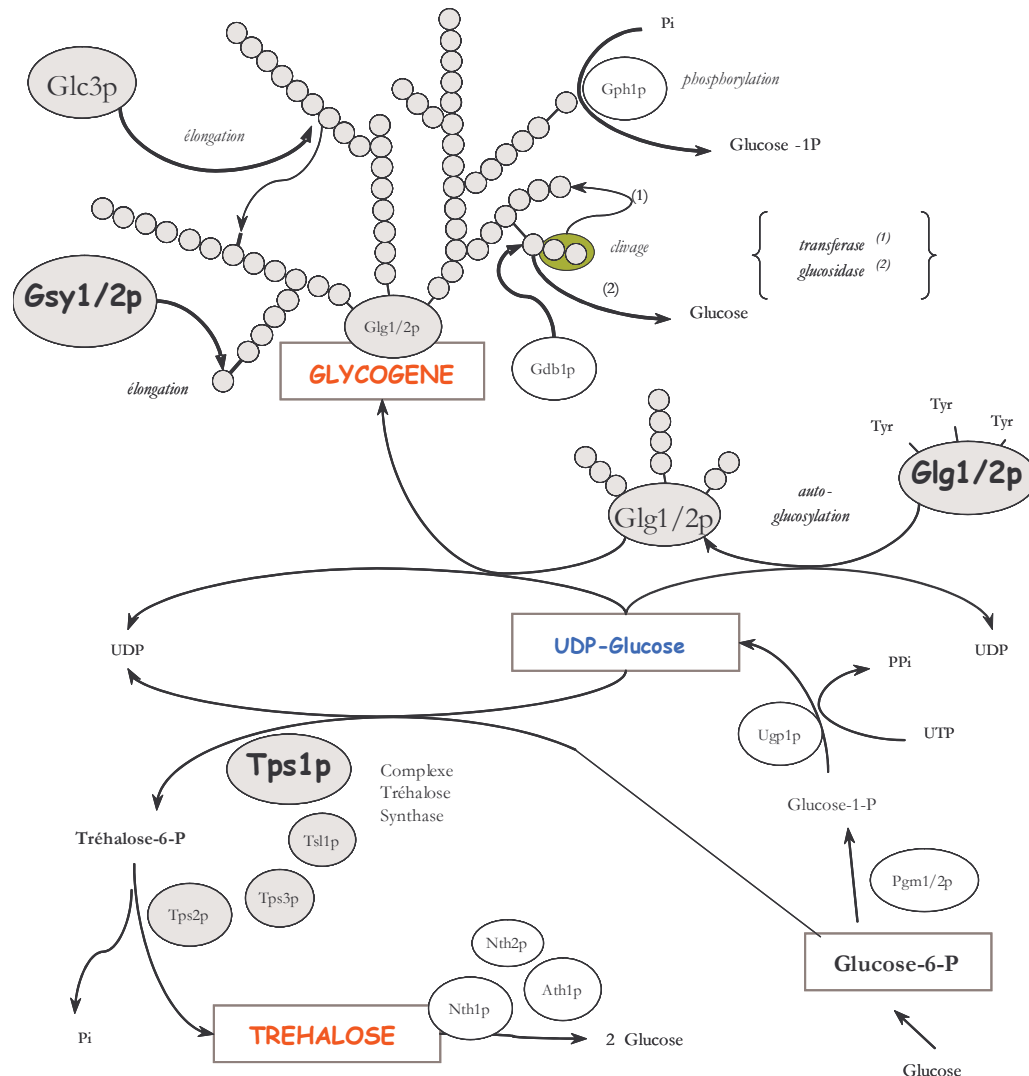


Figure 5 : Voies de synthèse et de dégradation du tréhalose et du glycogène chez *S. cerevisiae* (François et Parrou, 2001).

I.1.6.a. Le tréhalose

Le tréhalose est un dissaccharide constitué de deux sous unités glucose liées au niveau de leur carbone réducteur par une liaison α -(1,1). Il est connu pour son effet protecteur sur les membranes et sur les protéines de nombreuses plantes et micro-organismes. Le tréhalose intervient dans de nombreux mécanismes de stress cellulaire et se révèle indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire lorsque les conditions

deviennent défavorables à la croissance (Wiemken, 1990). Ainsi, il est connu pour être un facteur de protection avec deux rôles principaux :

- Avec l'action conjuguée des protéines chaperonnes de type Hsp104p, le tréhalose aide à la stabilisation des membranes qui permet à terme d'éviter la mort cellulaire sous conditions de pressions élevées (Crowe et coll., 1984 ; Singer et Linnquist, 1998).
- Le tréhalose et la molécule chaperonne Hsp104p sont tous les deux requis pour permettre un repliement correct des protéines dans le cytosol. Ainsi à des niveaux intracellulaires élevés, le tréhalose contrôle la dénaturation et la renaturation des protéines (Singer et Linnquist, 1998).

Le tréhalose est formé par la condensation de l'UDP-glucose et du glucose 6-P catalysée par la tréhalose-6-P synthase (Tps1p), suivie de l'hydrolyse du tréhalose-6-P en tréhalose et Pi par la tréhalose 6-P phosphorylase (Tps2p) (Figure 5).

La dégradation du tréhalose est assurée par deux tréhalases (Londesborough et Varimo, 1984) :

- La tréhalase acide (Ath1p) localisée dans les vacuoles, et dont l'activité optimale se situe à un pH compris entre 4,5 et 5.
- La tréhalase neutre (Nth1p) est cytosolique, son pH optimal se situe entre 6,8 et 7.

I.1.6.b. Le glycogène

Le glycogène est un polysaccharide ramifié, constitué d'unités glucose assemblées par des liaisons α -(1,4) dans ses parties linéaires et α -(1,6) au niveau des embranchements (toutes les 12 à 18 unités). Ainsi, la macromolécule possède une masse molaire considérable et variable.

D'un point de vue de ses dynamiques de production et de dégradation, le glycogène possède toutes les caractéristiques d'une substance de réserves. Ainsi au cours du processus de sporulation, il est accumulé au tout début de la formation des ascospores et est transformé en tréhalose en fin de sporulation (Wiemken, 1990). De même, en culture discontinue, il s'accumule avant que la source de carbone ne soit épuisée contrairement au tréhalose (François et Parrou, 2001).

La synthèse du glycogène débute par une phase d'initiation qui fait intervenir des glycogénines, protéines autoglycosylantes capables d'allonger une chaîne glycosylée par ajouts progressifs d'unités glucose sur des résidus tyrosine (Figure 5). Ces protéines codées chez *S. cerevisiae* par les gènes *GLG1* et *GLG2* vont créer la matrice d'unités de glucose liées en α -(1,4) requise à l'étape d'élongation et par conséquent à la synthèse du glycogène. Survient ensuite l'étape d'élongation où le polymère ainsi formé sert de substrat à la glycogène synthase qui forme des liaisons α -(1,4) à partir de l'UDP-glucose.

Les ramifications sont réalisées par l'amylo-(1,4-1,6)-glucosyltransférase (Glc3p), enzyme qui transporte un oligosaccharide de 6 à 8 résidus de l'extrémité non réductrice d'une chaîne à un site plus intérieur de la même chaîne en créant une liaison α -(1,6).

La glycogène phosphorylase (Gph1p) est la première enzyme de la voie de dégradation du glycogène et libère les unités glucose sous forme de glucose-1-P et réduit ainsi le glycogène en dextrine limite (l'enzyme s'arrête 4 résidus avant les liaisons α -(1,6)). Les branches de dextrine limite sont élaguées par les deux activités enzymatiques de l' α -(1,6) glucane-6-glucosyl transférase (Gdb1p). Cette enzyme possède une activité transférase qui transporte le trimère de maltotriose d'une branche sur l'extrémité de la chaîne principale en abandonnant un résidu glucose. Ce résidu est ensuite clivé par la seconde activité de l'enzyme de débranchement l' α -(1,6) glucosidase.

I.1.6.c. Rôle des sucres de réserve en conditions de stress

Beaucoup d'études montrent une corrélation entre le contenu intracellulaire en sucres de réserves et la capacité à survivre dans diverses conditions de stress. Ainsi, les sucres de réserves s'accumulent intracellulairement suite à différents stress tels qu'un choc thermique, une carence nutritionnelle ou une déshydratation (van Dijck et coll., 1995 ; Lillie et Pringle, 1980 ; Shima et coll., 1999). Un choc osmotique provoque aussi une variation des teneurs en sucres de réserves et est discuté dans le paragraphe III.1.2. Ces sucres accumulés dans la cellule ont été essentiellement considérés en tant que source de carbone et d'énergie de réserve mais ils sont néanmoins accumulés et dégradés de façon indépendante et jouent chacun un rôle distinct dans la cellule. La concentration exocellulaire en sels et oligo-éléments n'influe pas sur la concentration intracellulaire du tréhalose à partir du moment où la cellule n'est limitée ou carencée par aucun élément (Bagum et coll., 1998).

Stress thermique

L'accumulation rapide de tréhalose et de glycogène intracellulairement est une des principales conséquences du stress thermique (augmentation de 15°C) ; elle contribuerait à l'induction de la thermotolérance (Ribeiro et coll., 1997). Ce même phénomène a été observé par Parrou et coll. (1997) avec une accumulation de glycogène qui perdure dans le temps alors que l'accumulation du tréhalose n'est que transitoire suite à un choc thermique.

La congélation étant un procédé de conservation des levures couramment utilisé, il a été montré que la présence de tréhalose permet aux cellules de reprendre leur croissance rapidement après une phase de congélation (Coutinho et coll., 1988).

Limitation nutritionnelle

L'accumulation intracellulaire de carbohydrates est une réponse générale à une limitation nutritionnelle (Lillie et Pringle, 1980 ; Parrou et coll., 1999). Les cellules accumulent à la fois du tréhalose et du glycogène lorsqu'elles sont limitées ou carencées par un élément tout particulièrement lorsqu'il s'agit de l'azote, du soufre et du phosphore. La plus grande accumulation de réserves est observée en condition de carence azote ; la teneur en sucres est multipliée d'un facteur 2 et 4 respectivement par rapport à une carence en soufre et à une carence en phosphore (Lillie et Pringle, 1980).

Selon les conditions de culture, la dynamique d'accumulation des sucres de réserves diffère. Ainsi pour Lillie et Pringle (1980), pour des cultures en fioles d'Erlenmeyer, l'accumulation de glycogène débute instantanément après la limitation en azote alors que l'accumulation de tréhalose ne débute que 4 heures après. En réacteur batch, l'accumulation des deux sucres de réserves suite à une limitation azote est instantanée (Parrou et coll., 1999). En culture de type fed-batch, pendant une phase de 8 heures de carence azote, les teneurs en tréhalose et glycogène sont multipliées respectivement par un facteur 4,5 et 2,5 (Jorgensen et coll., 2002) avec une accumulation instantanée des deux types de sucres. Suite à une phase de carence azote, le pourcentage en tréhalose peut atteindre la valeur de 20 % de la matière sèche totale (Gélinas et coll., 1989).

I.1.7. Le transport chez la levure

Toutes les cellules ont besoin de puiser dans le milieu extérieur certains composés pour leur croissance. De même, elles rejettent dans le milieu des produits du métabolisme, des ions ou des toxines qui peuvent devenir inhibiteurs ou toxiques à la croissance et afin de maintenir leur intégrité cellulaire. Trois catégories distinctes permettent de diviser le processus de transport : la diffusion passive, la diffusion facilitée et le transport actif.

I.1.7.a. La diffusion passive

La diffusion passive est régie par la loi d'action de masse. Ce mécanisme peut être défini comme la migration des molécules à travers la membrane plasmique d'une région à forte concentration à une région à faible concentration. Ions et molécules organiques à faible poids moléculaire peuvent traverser la membrane. Le flux initial de la diffusion de la molécule est directement proportionnel à la concentration externe de la molécule. La diffusion s'arrête quand le potentiel électrochimique est identique de chaque côté de la membrane. La diffusion passive prend place sans interaction spécifique entre le soluté et les constituants de la membrane. Les petites molécules telles que l'oxygène, le CO₂, l'éthanol et les acides organiques traversent la membrane par simple diffusion.

I.1.7.b. La diffusion facilitée

Ce transport implique la présence d'un transporteur membranaire, généralement une protéine. Le flux de diffusion montre une saturation quand la concentration extérieure augmente ; le transport peut être inhibé par des structures analogues du soluté. Le mécanisme a lieu spontanément et ne demande pas d'énergie. Le flux net s'arrête quand le potentiel électrochimique est le même de part et d'autre de la membrane. Les transporteurs membranaires sont souvent des protéines (dans le cas des molécules organiques) ou des canaux (pour les ions). Chez *S. cerevisiae*, le transport des monosaccharides tels que le glucose, le fructose ou le mannose s'effectue par diffusion facilitée.

I.1.7.c. Le transport actif

Ce type de transport implique lui aussi la présence d'un transporteur. Il requiert de l'énergie, doit être lié à une réaction exergonique et fonctionne contre le gradient de concentration. Deux catégories principales existent au sein de ce transport : primaire et secondaire.

- Beaucoup d'ions entrent dans la cellule par un mécanisme de transport actif primaire. La réaction implique l'hydrolyse de l'ATP par une H^+ -ATPase. Les ions impliqués dans ce phénomène sont : Ca^{2+} , Na^+ , K^+ et H^+ . Beaucoup de composés organiques (sucres et acides aminés) entrent dans la cellule par un transport actif primaire impliquant des protéines spécifiques les perméases.

- Les mécanismes de transport actif secondaire couplent le mouvement d'un soluté dans le sens de son gradient de concentration avec celui d'un autre soluté sans interaction chimique directe par l'intermédiaire d'une perméase. Deux systèmes de cotransport existent, tout d'abord les symports dans lequel le transport du soluté dépend du transfert simultané ou consécutif d'un second soluté dans le même sens. Ce type de transport regroupe des couples : acides aminés/ H^+ , sucres/ H^+ , acides organiques/ H^+ . Ensuite, l'autre système correspond aux antiports qui transportent simultanément deux substances en sens opposé, l'une vers le cytosol, l'autre vers le milieu extérieur. Parmi ces antiports, il en existe plusieurs couplant un cation et un proton : Na^+/H^+ , K^+/H^+ , Ca^{2+}/H^+ .

I.2. Production de levures de boulangerie

La production de levures de boulangerie se fait en plusieurs étapes dont deux sont réellement déterminantes et donc seront détaillées ici. La première étape consiste à obtenir une forte concentration cellulaire de levures et la seconde consiste à placer les levures dans un état physiologique particulier en vue de leur utilisation ultérieure.

La première étape consiste en une croissance rapide avec un rendement de conversion du substrat en biomasse le plus élevé possible, croissance qui doit être couplée à une forte capacité panaière (Randez-Gil et coll., 1999). Cependant, *S. cerevisiae* est une levure Crabtree positive, par conséquent, pour l'obtention d'un rendement de conversion du substrat en biomasse le plus élevé possible, la production d'éthanol doit être évitée. Par conséquent, le taux de croissance utilisé doit être inférieur au taux de croissance critique. Le mode de production de levures de type fed-batch permet à *S. cerevisiae* de montrer un métabolisme complètement respiratoire en conservant un μ inférieur à μ_c . Lors de ce mode de production, le rendement de conversion du sucre en biomasse est de 0,5 g de biomasse.g⁻¹ de glucose (van Hoek et coll., 2000b).

Pendant la phase discontinue alimentée, la source de carbone et les autres éléments sont apportés en continu dans le réacteur. Le taux de croissance de la levure est alors contrôlé par le débit d'alimentation en source carbonée. Le débit maximal est limité par le transfert d'oxygène et la capacité de transfert thermique des bio-réacteurs.

Dans les systèmes de type fed-batch, un taux de croissance constant peut être atteint en utilisant plusieurs techniques :

- soit le débit de carbone est exponentiel et par conséquent le taux de croissance est constant (van Hoek et coll., 2000b),
- soit le contrôle du débit est assuré par une détermination en ligne de l'éthanol présent dans les gaz effluents du réacteur. Ainsi, le système régule le taux d'alimentation en sucre pour maintenir une faible concentration en éthanol dans le réacteur (Alberghina et coll., 1991).

Le procédé de production est ensuite terminé par une phase de carence azote pour augmenter la teneur en carbohydrates qui est connue pour améliorer la stabilité à la conservation (Caron, 1995) et augmenter la capacité fermentaire des levures (Attfield, 1997). D'un point de vue économique, l'optimisation du contenu cellulaire en tréhalose est un souci constant lors de la production industrielle de la levure (van Dijck et coll., 1995). La conservation des levures après production va dépendre de la formulation et donc par conséquent de l'utilisation ultérieure de la levure.

I.3. Capacité fermentaire

I.3.1. Définition

La qualité des levures de boulangerie commerciales est déterminée par beaucoup de paramètres : stabilité à la conservation, osmotolérance, résistance au froid et à la décongélation, résistance de la levure sèche à la réhydratation. Cependant, la capacité fermentaire des levures est leur rôle primaire et le paramètre le plus important.

Cette capacité se traduit dans le processus de fabrication du pain par une augmentation du volume de la pâte par production de CO₂ pendant la fermentation des

carbohydrates de la farine, par un développement de la structure et de la texture de la pâte par étirement dû à la formation de bulles, par une augmentation du goût, par un accroissement de la valeur nutritive du pain et pour le rendre plus digeste par l'hydrolyse des polysaccharides complexes et des protéines (Spicher et Brümmer, 1995). Afin de déterminer sa capacité fermentaire après sa production en fermenteur, la levure est placée en conditions anaérobies et l'aptitude de la levure à produire de l'éthanol et du CO_2 est mesurée, ces productions étant stœchiométriquement liées. En général des techniques conventionnelles manométriques sont utilisées (Umbreit et coll., 1964).

I.3.2. Facteurs influençant la capacité fermentaire

I.3.2.a. La physiologie de la levure

En théorie, le contrôle de la capacité fermentaire peut résider dans un des trois premiers points de contrôle présentés sur la figure 6 ou dans leur combinaison. Le premier point clé de ce contrôle se situe au niveau de l'entrée du sucre via un nombre important de transporteurs membranaires. Ensuite viennent les activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme du sucre via la glycolyse et enfin, la dernière étape se trouve au niveau de la fermentation alcoolique et de la régénération de l'ADP en ATP produit par la glycolyse.

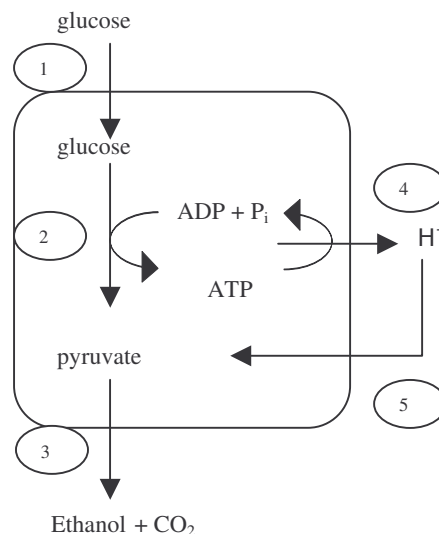


Figure 6 : Représentation schématique des procédés métaboliques qui pourraient exercer un contrôle sur la capacité fermentaire de *S. cerevisiae*. Les réactions numérotées représentent : 1, le transport du glucose ; 2, la glycolyse ; 3, les pyruvate décarboxylase et alcool déshydrogénase ; 4, l'ATPase membranaire ; 5, l'entrée des protons.

Une perte de la capacité du transport du glucose est corrélée à une diminution de la capacité fermentaire pendant des phases de limitations nutritionnelles telles que des limitations carbone et azote. Néanmoins, cette perte de capacité fermentaire n'est pas

seulement due à la réduction de la capacité de transport du glucose mais aussi à d'autres phénomènes non identifiés à ce jour (Rossel et coll., 2002).

Une corrélation entre la capacité fermentaire et l'activité de certaines enzymes de la glycolyse a été démontrée dans plusieurs conditions de culture. Ainsi, parmi les enzymes de la glycolyse, seules la pyruvate décarboxylase et la phosphofructokinase montrent une corrélation positive et nette avec la capacité fermentaire en culture continue. En effet, pour une capacité fermentaire multipliée par deux, les activités de ces enzymes sont également augmentées d'un facteur deux. Cependant, cette corrélation dépend des souches de levures utilisées. Par ailleurs, en mode discontinu alimenté, il n'y a aucune corrélation entre la capacité fermentaire et les niveaux d'activité de ces enzymes clés de la glycolyse ; les activités restent constantes alors que la capacité fermentaire augmente (van Hoek et coll., 1998, 2000a et 2000b ; Nilsson et coll., 2001). Néanmoins, il semblerait qu'une surexpression simultanée de plusieurs enzymes de la glycolyse permette d'augmenter la capacité fermentaire. Ainsi, une augmentation d'expression des gènes codant pour les enzymes de la partie basse de la glycolyse (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, phosphoglycérate mutase, phosphoglycérate kinase, émolase, pyruvate kinase, pyruvate décarboxylase et alcool déshydrogénase) provoque pour des levures cultivées en culture continue oxydative une productivité en éthanol multipliée par un facteur deux par rapport à une souche sauvage (Smits et coll., 2000).

I.3.2.b. Le procédé de production

Pour des conditions purement oxydatives (c'est à dire taux de dilution (D) inférieur au taux de dilution critique (μ_c ou D_c)), la capacité fermentaire mesurée hors ligne est proportionnelle à D . Elle augmente linéairement avec le taux de dilution pour atteindre un maximum de 21 mmol d'éthanol produit. $g^{-1}.h^{-1}$, à D légèrement inférieur à μ_c (0,25 h^{-1} et 0,28 h^{-1}) (Figure 7). Lorsque D est supérieur à μ_c , la capacité fermentaire n'augmente plus proportionnellement à D et le gain de productivité pour un taux de dilution élevé (0,4 h^{-1}) par rapport à μ_c n'est que de 10 % (van Hoek et coll., 1998). Il est intéressant de noter que dans la région autour du taux de croissance critique, bien que le flux glycolytique en mode oxydatif soit plus faible, la capacité fermentaire est équivalente à celle d'un métabolisme oxydo-réductif.

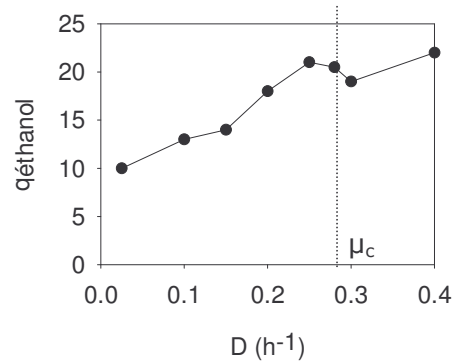


Figure 7 : Effet du taux de dilution sur la capacité fermentaire de *S. cerevisiae* mesurée hors ligne avec $\mu_c = 0,28 \text{ h}^{-1}$. La capacité fermentaire ($q_{\text{éthanol}}$) est mesurée en conditions d'anaérobiose sur milieu synthétique et est exprimée en mmol d'éthanol produites.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ (Van Hoek et coll., 1998).

Le procédé de production lui-même peut améliorer la capacité fermentaire de la levure. En effet, la capacité fermentaire de la levure après conservation à froid dépend de l'état physiologique de la levure en fin de procédé (Nilsson et coll., 2001). Cette observation est complétée par Thomsson et coll. (2003) qui montrent que des cellules carencées en carbone en fin de production montrent une perte complète de la capacité fermentaire. Cette incapacité résulterait d'un manque d'énergie instantanément disponible.

Lors du procédé de production, la levure subit une phase de carence en azote qui a pour but d'augmenter les teneurs en sucres de réserves. Van Hoek et coll. (2000a) montrent que des souches industrielles de levures subissant une phase de carence en azote en culture continue oxydative ont une meilleure productivité en éthanol que des levures cultivées en régime oxydatif sans carence nutritionnelle. Cette amélioration est observée uniquement si la productivité est exprimée par rapport au contenu protéique de la levure et non pas par rapport à la masse sèche. Cependant, ces résultats ne sont pas confirmés en procédé de type fed-batch où une carence en azote de 8 heures ne permet pas d'augmenter la capacité fermentaire (Jorgensen et coll., 2002).

II. Effets des acides faibles sur le métabolisme de *S. cerevisiae*

Dès 3000 avant JC, le problème de la conservation des aliments est apparu et quelques solutions ont été trouvées comme le salage de la viande ou le fumage de la viande et du poisson. L'idée d'utiliser un agent conservateur date de nombreuses années et ainsi, l'anhydride sulfureux est utilisé pour la conservation des vins depuis des siècles. Par la suite, il s'est avéré primordial que des mesures soient prises à la fois pour améliorer la stabilité mais aussi pour la sécurité des consommateurs et donc de

nouveaux agents conservateurs sont apparus. Cependant, cette stratégie de conservation a imposé de nouvelles contraintes autant au niveau de la sécurité alimentaire pour le consommateur qu'au niveau de la qualité du produit lui-même qui ne doit pas être altéré par le conservateur et dont le goût, la texture et la couleur ne doivent pas varier.

Les agents conservateurs les plus couramment utilisés sont les acides faibles comme par exemple les acides acétique, propionique, benzoïque, et sorbique. Ces molécules inhibent le développement des bactéries et des champignons ; l'acide sorbique est aussi décrit comme inhibant la germination et le développement des spores de bactéries (Blocher et Busta, 1985). Le tableau 2 présente les concentrations minimales inhibitrices (MIC) de plusieurs agents conservateurs nécessaires pour inhiber la croissance cellulaire de diverses levures. Beaucoup de facteurs environnementaux affectent cette MIC, le plus important étant le pH. En effet, l'inhibition des levures par les agents conservateurs présentés dans le tableau 2 est plus importante pour des valeurs plus faibles de pH (c'est à dire à des pH de 3 ou 4).

Tableau 2 : Concentrations minimales en agents conservateurs (MIC) requises pour inhiber la croissance des levures à des pH voisins de 5 (Fleet, 1992).

Souches	MIC			
	Acide benzoïque mg.L ⁻¹	Acide sorbique mg.L ⁻¹	Acide acétique g.L ⁻¹	Acide propionique g.L ⁻¹
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	600 (1300)	600 (1200)	25	15
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	200 (330)	500 (1200)	9	3
<i>Candida krusei</i>	300 (440)	300	15	8
<i>Pichia membranaefaciens</i>	200	200	20	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	300 (600)	600	16	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100 (175)	200	10	6
<i>Hansenula anomala</i>	140 (225)	150	6	4
<i>Kloeckera apiculata</i>	125 (190)	200	6	3
<i>Kluyveromyces maexianus</i>	125 (175)	150	6	3
<i>Rhodotulola rubra</i>	100	< 100	<1	-
<i>Brettanomyces intermedius</i>	300	400	-	-

Les chiffres entre parenthèses sont les valeurs obtenues pour des levures adaptées, c'est-à-dire lors d'une deuxième exposition à l'acide ; cette adaptation sera discutée dans le paragraphe II.3.

Les mécanismes d'action de ces agents conservateurs sont étudiés depuis de nombreuses années et sont divers et variés. Leurs différentes cibles d'action vont être présentées et discutées dans les paragraphes suivants.

II.1. Transport des acides dans la cellule

II.1.1. Dissociation de l'acide en solution et entrée dans la cellule

En solution, les acides faibles existent sous la forme d'un équilibre entre les formes protonées et dissociées. Ces deux formes coexistent et la répartition de ces deux formes dépend de la constante de dissociation de l'acide (K_a) et du pH de la solution. L'équilibre de ces deux formes est défini par l'équation d'Henderson-Hasselbach :

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad \text{Equation 5}$$

Les petites molécules comme les acides organiques sous forme protonée franchissent librement la membrane par simple diffusion alors que la perméabilité de la forme chargée (dissociée) est considérée comme négligeable (Kell et coll., 1981 ; Krebs et coll., 1983 ; Warth, 1989b). Par suite, les concentrations de la forme neutre de part et d'autre de la membrane plasmique tendent à s'égaliser. En supposant que la valeur de la constante de dissociation de l'acide (K_a) est la même de part et d'autre de la membrane, il en résulte que l'acide se distribuera à travers celle-ci selon la différence de pH existante entre les deux côtés de la membrane. En entrant dans la cellule dont le pH est plus élevé qu'en exocellulaire, l'acide se dissocie en relargant des protons et la forme anionique de l'acide dans le cytosol ; cette dernière forme ne peut plus traverser la membrane plasmique (Figure 8). De plus, les acides faibles (notamment les acides formique et acétique) une fois entrés dans le cytosol de la cellule peuvent diffuser jusqu'à la mitochondrie sous forme protonée (Brierley et coll., 1968).

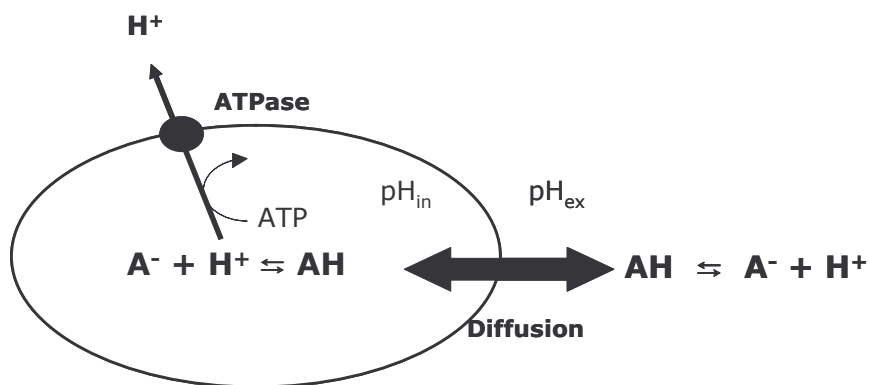


Figure 8 : Equilibre des différentes formes d'un acide faible entre le milieu extérieur et le cytosol.

II.1.2. Entrée des acides faibles à l'intérieur de la cellule par des transporteurs spécifiques.

En plus de la diffusion passive précédemment décrite, les acides faibles peuvent entrer dans la cellule par différents mécanismes de transport qui dépendent de la source carbonée dégradée par la levure. Ainsi, lorsque *S. cerevisiae* est cultivée sur une source de carbone autre que le glucose, certains acides faibles pénètrent dans la cellule à l'aide de transporteurs spécifiques (Casio et coll., 1987, Casal et coll., 1996, 1998).

Cultivée sur l'acide lactique, la levure utilise un même transporteur pour les acides acétique, pyruvique, propionique et lactique. Il s'agit d'un symport proton-lactate avec une stœchiométrie de 1:1. Ce symport est inductible par la présence d'acides faibles et est sujet à la répression par le glucose (Casio et coll., 1987 ; Casal et coll., 1998).

Si l'acide acétique et l'éthanol sont présents dans le milieu de culture et utilisés comme source de carbone, les cellules sont capables de transporter les acides acétique, propionique et formique par le même symport proton-monocarboxylate, ce dernier étant imperméable aux acides lactique et pyruvique. La particularité de ce transporteur résiderait dans le fait que la forme anionique serait transportée à l'intérieur de la cellule. Ce transporteur est constitutif et réprimé sur glucose, fructose, maltose, sucrose ou galactose (Casal et coll., 1996).

La présence de transporteurs spécifiques (deux perméases distinctes) pour les acides lactique, acétique, propionique, pyruvique et formique est aussi rapportée par Casal et Leao (1995) pour *Torulaspora delbrueckii* selon la source de carbone utilisée. Ces systèmes sont inductibles par les acides et réprimés par le glucose, le fructose et le saccharose.

II.2. Descriptions des effets sur le métabolisme de *S. cerevisiae*

Les mécanismes par lesquels les acides faibles, en particulier les acides benzoïque et propionique, utilisés comme conservateurs bloquent la croissance microbienne ont été l'objet de nombreuses études.

Plusieurs théories ont été émises en terme d'inhibition de la croissance cellulaire : les acides faibles peuvent avoir un effet sur le pH intracellulaire, pH_i (Krebs et coll., 1983), sur différentes enzymes de la glycolyse (François et coll., 1986), sur le potentiel trans-membranaire (Lopez et coll., 1999) ou sur l'énergétique cellulaire (Holoak et coll., 1996 ; Bracey et coll., 1998a). Plusieurs études évoquent même une relation entre ces phénomènes. A tous ces effets, il convient d'ajouter le rôle des acides faibles sur les teneurs intracellulaires en sucres de réserves et cations (Cheng et coll., 1999 ; Mori et coll., 1998). Ils peuvent aussi influencer la production de radicaux libres et impliquer un stress oxydatif (Piper et coll., 2001).

II.2.1. Le pH_i au cœur de la réponse cellulaire

II.2.1.a. Baisse du pH_i et inhibition des activités métaboliques essentielles

La levure requiert de maintenir son pH_i dans une gamme physiologique comprise entre 6,8 et 7,2 (Navon et coll., 1979 ; Nicolay et coll., 1982) qui est essentielle pour un nombre important de processus métaboliques vitaux. Les changements de pH_i peuvent réguler d'importants processus cellulaires comme la division cellulaire (Anand et Prasad, 1989), l'induction de la synthèse de protéines de stress thermique et de la thermotolérance (Weitzel et coll., 1987 ; Coote et coll., 1991). De plus, l'activité des enzymes-clés de la glycolyse est dépendante du pH_i et tout particulièrement la phosphofructokinase (Pf1kp) (François et coll., 1986). Tout changement du pH_i influe donc sur l'activité globale de la levure.

L'acide en entrant dans la cellule se dissocie et libère des protons, ces protons participent à la diminution du pH_i de la levure. Cette observation suite à des ajouts d'acides est confirmée pour différents acides par de nombreux auteurs : l'acide acétique (Pampulha et Loureiro-Dias, 1989 ; Carmelo et coll., 1997 ; Guldfieldt et Arneborg, 1998) et l'acide benzoïque (Krebs et coll., 1983). Cependant après l'addition d'acide sorbique aucune variation du pH_i n'est observée (Bracey et coll., 1998b). Ainsi, pour *S. cerevisiae*, l'ajout de 2,7 mM d'acide acétique provoque la diminution du pH_i d'1 unité pH. Cette diminution est d'autant plus importante que la concentration en acide est élevée (Arneborg et coll., 2000). Cette baisse du pH_i est aussi relatée pour *Zygosacharomyces bailii* en présence d'acide benzoïque (Warth, 1991).

Cette acidification du cytosol après l'entrée de l'acide dans la cellule peut avoir un effet direct sur la physiologie de la levure selon certains auteurs. En effet, il est relaté que cette diminution du pH_i empêche la croissance en inhibant la glycolyse (Krebs et coll., 1983 ; François et coll., 1986), et le transport actif (Freese et coll., 1973) ou interfère avec la transduction du signal (Thevelein, 1994). Cette baisse du pH_i est aussi décrite comme étant la cause principale du temps de latence observé après un choc acide. Une fois que la levure a retrouvé un pH_i proche du pH physiologique, la croissance reprend (Lambert et Stratford, 1999).

Concernant tout particulièrement la glycolyse, l'acidification du cytosol suite à l'ajout d'acide benzoïque implique une inhibition spécifique de la phosphofructokinase (Pf1kp), enzyme intervenant dans la transformation du fructose-6-P en fructose-1,6-P₂ (Krebs et coll., 1983). En effet, ces auteurs observent une réduction du taux de fermentation du glucose et l'accumulation des intermédiaires glycolytiques situés avant la Pf1kp. Ce modèle de base a été confirmé et complété par François et coll. (1986). La Pf1kp est effectivement inhibée après l'addition d'acide benzoïque mais à cette inhibition s'ajoute une réduction des niveaux de fructose-2,6-P₂ connu pour être un activateur

potentiel de la Pf1kp. La diminution de la concentration de cet intermédiaire est expliquée par une inhibition de l'enzyme Pf2kp par des faibles pH_i , cette enzyme intervient dans la transformation du fructose-6-P en fructose-2,6-P₂ (François et coll., 1986).

Cette inhibition de la glycolyse a été démontrée sur des cellules en phase stationnaire de croissance. En revanche, sur des cellules en phase exponentielle de croissance, en batch (Warth, 1991) et en cultures continues (Verduyn et coll., 1990a, 1990b, 1992a), la glycolyse est accélérée et aucune inhibition de l'activité de la Pf1kp n'est détectée. Bien que l'inhibition du flux glycolytique soit à rejeter, la Pf1kp semble avoir un rôle dans la tolérance à l'acide benzoïque. En effet, des niveaux de cette enzyme augmentés par manipulation génétique induisent une résistance accrue de *S. cerevisiae* à l'acide benzoïque (Pearce et coll., 2001) et des mutants $\Delta pfk1$ et $\Delta pfk2$ montrent une forte sensibilité à l'acide sorbique (Mollapour et coll., 2004).

II.2.1.b. Systèmes de régulation de pH_i mis en place

La levure suite à un stress acide met en place différents systèmes de régulation de son pH_i .

Selon certains auteurs, l'acidification du cytosol est immédiate suite à l'ajout d'acide dans le milieu de culture mais n'est que transitoire (Thevelein et coll., 1987a ; 1987b). La diminution du pH_i est proportionnelle à la concentration en forme non dissociée de l'acide et au-delà d'une certaine concentration (comme par exemple 41 mM d'acide acétique en anaérobiose), la levure ne peut plus réguler son pH_i (Arneborg et coll., 2000). La présence de glucose permet d'accélérer le phénomène de régulation du pH_i . Ainsi, pour des cultures réalisées en présence ou non de glucose, si 2,7 mM de forme non dissociée d'acide propionique sont ajoutés dans le milieu, le pH_i de la levure retrouve sa valeur précédant le pulse 2 minutes après l'ajout d'acide en présence de sucre et en 5 minutes en son absence (Arneborg et coll., 2000).

Principal mécanisme de régulation du pH_i : l' H^+ -ATPase

La perméabilité sélective de la membrane plasmique aux protons permet à la cellule de créer un potentiel chimique de protons (ΔpH) et un potentiel électrique ($\Delta \Psi$), qui tous deux forment la force proton motrice ΔP (cf. équation 1, § I.1.1.).

Les cellules requièrent une membrane plasmique intacte pour maintenir un pH_i dans une gamme de pH physiologique pour une activité optimale de processus métaboliques. Chez la levure, afin de maintenir l'homéostasie et le pH_i , il faut une activité de l' H^+ -ATPase de la membrane plasmique qui couple l'hydrolyse de l'ATP à l'expulsion de protons et donc génère la force proton motrice (Figure 8, p. 42). Chez *S. cerevisiae*, l' H^+ -ATPase est la plus abondante des protéines membranaires plasmiques constituant 20 % de la totalité des protéines.

Des pH acides favorisent une forte activité de l'H⁺-ATPase. En effet, des levures se développant à des pH externes inférieurs à 4 montrent une activité de l'ATPase membranaire 2 à 3 fois plus importante que des cellules cultivées à pH 5 et seules les cellules capables d'activer leur H⁺-ATPase maintiennent un pH_i constant (Eraso et Gancedo, 1987).

L'augmentation de l'activité de l'H⁺-ATPase de la membrane plasmique suite à une exposition à des acides faibles a été reportée pour différents acides : acétique (Carmelo et coll., 1997 ; Arneborg et coll., 2000), sorbique (Holyoak et coll., 1996 ; Bracey et coll., 1998a) et octanoïque (Viegas et Sa-correia, 1991 ; Viegas et coll., 1998). Par ailleurs, Kubo et Lee (1998) ont montré l'importance de la présence de cette protéine ; en effet, l'ajout d'inhibiteurs de l'H⁺-ATPase plasmique provoque une plus forte inhibition de la croissance en présence d'acide sorbique. De plus, des mutants délétés pour cette protéine sont hyper sensibles à l'acide sorbique (Mollapour et coll., 2004).

Le cycle ATP-ADP est le mode fondamental d'échange d'énergie dans les systèmes biologiques. Pour des levures en conditions de croissance dites « normales », c'est-à-dire sans stress, l'H⁺-ATPase utilise 15 % de l'ATP produit mais elle peut utiliser jusqu'à 50 % de l'ATP dans des conditions particulières de stress, comme par exemple un stress thermique (Piper, 1993). Dans le cas d'un stress acide, le phénomène d'extrusion du proton requiert une quantité importante d'ATP qui n'est plus disponible pour la croissance cellulaire (Bracey et coll., 1998a). Réduire le pH exocellulaire de 4,5 à 3,8 provoque une diminution d'un facteur 100 de la concentration intracellulaire en ATP bien que le taux de croissance maximal ne soit pas affecté (Holyoak et coll., 1996). Suite à un stress acide, l'inhibition du taux de croissance corrèle avec une augmentation du ratio $\frac{ADP}{ATP}$ intracellulaire après exposition à l'acide sorbique. En effet, ce ratio augmente très rapidement suite à un pulse d'acide sorbique, puis retrouve sa valeur précédent le pulse progressivement. La réduction du pool intracellulaire en ATP après exposition à l'acide faible peut être due à l'activation de l'H⁺-ATPase membranaire tentant de restaurer l'homéostasie (Holyoak et coll., 1996). En réponse à l'acidification, l'H⁺-ATPase pompe les protons en dehors de la cellule. Cet excès de consommation d'énergie serait donc la principale action inhibitrice des acides faibles et expliquerait la réduction du rendement en biomasse pour des levures limitées en glucose (Lambert et Stratford, 1999). Dans ce cas d'inhibition, seule la consommation d'ATP est augmentée, sans affecter la production et par conséquent, la glycolyse n'est pas inhibée (Holyoak et coll., 1996). Néanmoins, ces résultats ne sont pas validés en culture continue. Suite à un pulse d'acide benzoïque, la concentration intracellulaire en ATP subit une augmentation d'un facteur 2 et les

auteurs concluent à une inhibition de la consommation de l'ATP (Verduyn et coll., 1992a).

D'un point de vue dynamique cette unique sortie de protons ne permet pas d'expliquer la régulation du pH_i . L'exportation des protons hors de la cellule va provoquer un déséquilibre ionique et donc va accélérer l'entrée de la forme non dissociée de l'acide dans le cytosol. L' H^+ -ATPase continuerait de fonctionner et il en résulterait une forte accumulation intracellulaire de la forme anionique de l'acide, participant à augmenter la pression osmotique de la levure et à déséquilibrer le potentiel électrique. C'est pourquoi Holyoak et coll. (1999) ont proposé l'existence d'un système qui ferait ressortir cette forme de l'acide. Il s'agit d'une protéine membranaire Pdr12p. Le mécanisme d'induction de l'expression de cette protéine n'est pas connu mais il pourrait résider dans une concentration intracellulaire en anions élevée (Piper et coll., 2001), agissant directement sur le facteur de transcription. Son mécanisme d'action sera discuté dans le paragraphe II.2.3.b.

Importance des vacuoles pour réguler le pH intracellulaire

La vacuole est un organite acide qui est impliqué dans la dégradation des macromolécules intracellulaires, dans la compartimentation des métabolites et des ions et dans l'homéostasie cellulaire (Klionsky et coll., 1990). Les valeurs calculées pour le pH de la vacuole (pH_v) plus faibles que celles calculées pour le cytosol peuvent indiquer que cet organite participe à la régulation du pH_i (Calahorra et coll., 1998). L' H^+ -ATPase vacuolaire maintient l'acidité de la vacuole (pH 6,2) et génère un potentiel électrique qui est utilisé pour conduire le transport secondaire de petites molécules dans cet organite (Mollapour et coll., 2004). La régulation observée du pH à travers la membrane vacuolaire peut donc être assurée par la modulation du potentiel de membrane vacuolaire, par le changement de sa conductivité ionique ou par l'activation de H^+ -ATPases vacuolaires (Carmelo et coll., 1997).

Le rôle de la vacuole dans l'homéostasie du pH_i suite à un stress acide a été suggéré par la caractérisation de plusieurs mutants. En effet, les mutants sans vacuole sont sensibles aux faibles pH (Klionsky et coll., 1990) et les mutants délétés pour l' H^+ -ATPase vacuolaire voient leur croissance inhibée en présence d'acide sorbique (Mollapour et coll., 2004). Les résultats obtenus par Carmelo et coll. (1997) et Chattopadhyay et coll. (2000) indiquent également que la vacuole joue un rôle additionnel dans l'homéostasie du pH_i . Le pH_v est maintenu à un pH acide (autour de 6) quand le cytosol est à un pH neutre. Cependant, quand des cellules sont incubées à pH acide (pH 3,5), en particulier quand l'acide acétique est employé comme acidulant, le pH_v devient fortement acide accompagnant la diminution du pH_i (Carmelo et coll., 1997). Ces travaux ont été confirmés par Cabral et coll. (2004) avec une caractérisation supplémentaire de l' H^+ -

ATPase vacuolaire. Un stress modéré à l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (herbicide) provoque une augmentation de l'activité de cette protéine d'un facteur 5 et est simultanée à une suractivité de l' H^+ -ATPase plasmique (Cabral et coll., 2004).

Les cations

L'homéostasie des concentrations intracellulaires des ions est une propriété fondamentale des cellules vivantes. Beaucoup de paramètres physiologiques tels que le volume cellulaire, la pression de turgescence, le pH_i , la force ionique et la concentration en cations dépendent de la régulation des flux d'entrée et de sortie des deux principaux cations Na^+ et K^+ (Tosteson et Hoffman, 1960 ; Rothstein, 1959). Les eucaryotes emploient un transport actif primaire assuré par des ATPases et un transport secondaire assuré par des canaux et des co-transporteurs pour maintenir une concentration intracellulaire en K^+ élevée et une faible concentration intracellulaire de l'ion toxique Na^+ . Le potassium est reconnu comme ayant un rôle important dans la régulation du pH_i de la levure en conditions normales de croissance (Yenush et coll., 2002).

Suite à un stress acide, chez *S. cerevisiae*, la régulation du pH_i exige une exportation nette de protons en réponse à l'entrée de l'acide dans le cytosol. Cette exportation de protons provoque une accumulation de la forme anionique de l'acide qui ne peut pas diffuser librement à travers la membrane, induisant ainsi une perturbation dans le potentiel membranaire (Lopez et coll., 1999). Ce transfert net de protons à travers la membrane peut être compensé par une entrée équivalente de cations qui permettrait de maintenir le potentiel membranaire en neutralisant les anions du cytosol. La levure possédant un antiport K^+/H^+ (Rodriguez-Navarro, 2000), cet échange permettrait d'éviter une dépense énergétique due à l'expulsion des protons par l'ATPase membranaire. Néanmoins, un sel d'acide s'accumule intracellulairement et une trop forte concentration pourrait alors provoquer un déséquilibre de la pression osmotique de la levure.

Les acides formique, propionique, acétique et butyrique provoquent une entrée d'ions potassium (Ryan et coll., 1971 ; Ryan et Ryan, 1972 ; Peña, 1975). Cette entrée de potassium suite à un stress acide semble être indépendante des conditions de cultures (glucose ou éthanol en aérobiose ou glucose en anaérobiose, Peña, 1975) mais d'autres auteurs observent une entrée de potassium différente selon la source de carbone utilisée. Ainsi suite à un stress acide, cultivées sur éthanol, les cellules voient leur concentration en potassium augmenter alors que sur glucose la concentration de cet ion reste inchangée (Lopez et coll., 1999). Par ailleurs, des mutants délétés pour le transporteur forte affinité du potassium (Trk1p) montrent une sensibilité accrue en réponse à un pulse d'acide benzoïque (Macpherson et coll., 2005).

Cependant, le potassium n'est pas le seul cation à voir sa concentration intracellulaire augmenter suite à un stress acide. En effet, après un choc à l'acide

salicylique, la teneur intracellulaire en cations Ca^{2+} augmente (Mori et coll., 1998). Cet accroissement intracellulaire est proportionnel à la quantité d'acide introduit mais est aussi fonction du pH de la culture. En revanche, pour les acides butyrique, sorbique et benzoïque, aucune accumulation intracellulaire de Ca^{2+} n'est observée (Mori et coll., 1998).

II.2.1.c. Effet découplant des acides faibles

La théorie de Mitchell postule que le transport des électrons dans la chaîne respiratoire s'accompagne d'une translocation de protons et génère une force proton motrice (cf. § I.1.1.). L'effet inhibiteur des acides est alors attribué à une action découplante conduisant à l'abolition du gradient de pH transmembranaire et donc par conséquent de la force proton motrice (Verduyn et coll., 1992a ; Stratford et Anslow, 1996).

Le « découplage » de cette force se traduit par une recirculation cyclique et non finalisée de protons à travers la membrane (Figure 9). En revanche, les acides n'interfèrent pas avec le transport des électrons. De ce fait, le rendement de la phosphorylation diminue et pour une demande énergétique donnée, la consommation d'oxygène est plus importante.

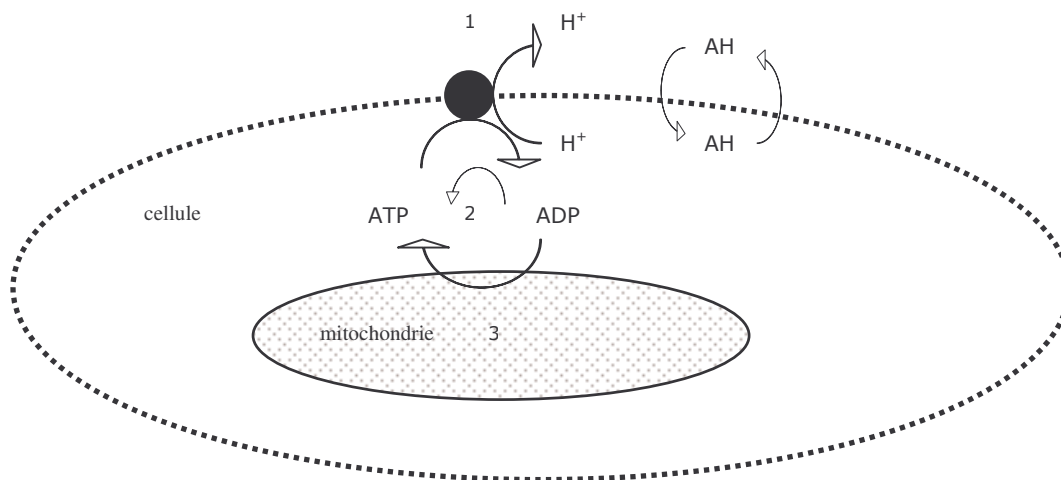


Figure 9 : Représentation schématique de l'effet découplant des acides au niveau de la membrane plasmique. 1 : ATPase membranaire, 2 : ATP génération par la phosphorylation du substrat, 3 : génération d'ATP par la respiration.

Verduyn et coll. (1992a) effectuent des ajouts d'acides faibles non métabolisables tels que l'acide benzoïque dans le milieu d'alimentation des cultures continues sur glucose. Ils dépassent ainsi la capacité respiratoire maximale de leur souche qui est de $q_{\text{O}_2 \text{ max}} = 12 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. La figure 10 montre une augmentation de la respiration aux taux de croissance faibles à modérés jusqu'à $0,2 \text{ h}^{-1}$ en présence d'acide benzoïque. La

q_{O_2} atteint un maximum d'environ 21 mmole. $g^{-1}.h^{-1}$ baptisée alors capacité respiratoire critique. La levure conserve un métabolisme oxydatif avec un rendement en biomasse diminué et une maintenance accrue qu'ils imputent au découplage énergétique. L'augmentation de ce coefficient de maintenance a été constatée et vérifiée en culture continue anaérobie en présence d'acides acétique ou propionique dans le milieu d'alimentation en plus du glucose (Verduyn et coll., 1990b). Selon ces auteurs, l'effet des acides faibles sur la respiration est indépendant du taux de croissance, fonction seulement de la maintenance énergétique due au découplage et proportionnel à la quantité d'acide présente.

En présence d'un acide faible découplant, à faible taux de croissance, les potentialités respiratoires de *S. cerevisiae* peuvent donc dépasser celles déterminées en cultures continues aérées sur glucose à μ_c . Néanmoins, il est intéressant de remarquer que ce découplage est seulement possible aux taux de croissance faibles à modérés, et ce phénomène est non élucidé par Verduyn et coll. (1992a). De plus, que ce soit en présence de [glucose + acide benzoïque] ou [glucose + acide propionique], Postma et coll. (1989) indiquent que la bascule en métabolisme oxydo-réductif survient à des taux de dilution différents, dépendants de la concentration en acide, mais pour une même valeur de $q_{O_2 \max}$, ce qui va dans le sens de l'hypothèse de Sonnleitner et Käppeli (1986) sur la capacité respiratoire limite correspondant à μ_c .

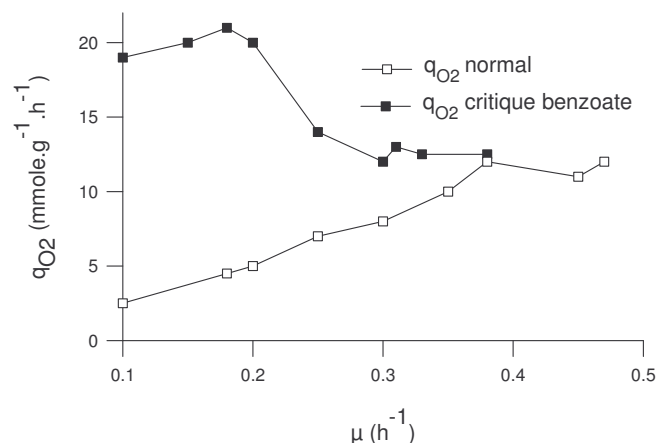


Figure 10 : Consommation spécifique d'oxygène en culture continue aérée sur glucose en absence ou en présence de l'acide benzoïque (Verduyn et coll., 1992a).

Un point particulier de cette théorie d'effet découplant des acides faibles ne corrobore pas avec les observations obtenues suite à un pulse d'acide. En effet, dans la littérature, il est décrit que l'effet des acides réside dans une demande en ATP accrue, indiquée par des niveaux très faibles intracellulaires en ce métabolite après un stress acide (Holyoak et coll., 1996). Les auteurs déduisent alors que la production de

l'énergie n'est pas altérée par la présence d'acide faible ce qui est en contradiction avec la définition même d'un agent découplant.

Par ailleurs, il est très peu discuté dans la littérature du mécanisme d'action des acides faibles qui leur permet de rendre la membrane plasmique perméable aux protons. Une possibilité serait, en plus du transport de l'acide par diffusion passive, une apparition de changements dans la fluidité de la membrane ou un changement dans des micro-domaines de la membrane impliquant une perturbation des mouvements et de la dynamique de celle-ci (Hazan et coll., 2004). Ces changements de fluidité membranaire sont aussi soulignés par Ferreira et coll. (1997) qui remarquent une corrélation entre la liposolubilité des acides faibles et l'inhibition de la fermentation. Plus l'acide faible est lipophile et plus il est inhibiteur.

II.2.2. Quel est le rôle des réserves intracellulaires en présence d'acides faibles ?

Les acides faibles ont des effets divers et variés sur les réserves intracellulaires selon les conditions de culture et les acides faibles utilisés.

L'accumulation intracellulaire de tréhalose d'un facteur 3 est observée par Cheng et coll., (1999) suite à un pulse de 9 mM d'acide sorbique pour des expérimentations réalisées à des pH acides. Cette accumulation de tréhalose est expliquée par plusieurs auteurs comme une inhibition de la Pf1kp. En effet, l'inhibition de cette enzyme implique une augmentation des niveaux intracellulaires du glucose-6-P et du fructose-6-P (Pearce et coll., 2001). Le dernier métabolite étant un activateur potentiel de la tréhalose synthase (François et Parrou, 2001), son accumulation intracellulaire provoquerait une surproduction de tréhalose. Une accumulation identique a été observée en présence d'acide octanoïque (Alexandre et coll., 1998).

Par opposition à ces observations suite à un stress acide, des études réalisées dans des environnements contrôlés, en phase exponentielle de croissance cellulaire montrent la dégradation des carbohydrates. Ainsi, en cultures continues anaérobies, un pulse d'acide acétique (30 mM) provoque une diminution de la concentration en tréhalose (perte de 18 % et de 16 % des niveaux de réserves pour des taux de dilution respectifs de 0,05 h⁻¹ et 0,1 h⁻¹) (Arneborg et coll., 1995). Des résultats similaires ont été obtenus en conditions oxydatives, à un taux de dilution de 0,05 h⁻¹. Après un ajout d'acide acétique (1,66 mM), la moitié des réserves intracellulaires de glycogène et de tréhalose ont été consommées (Guillou, 1996 ; Poilpre, 2002). Suite au pulse, le tréhalose et le glycogène sont rapidement dégradés dans les 45 premières minutes de la dynamique, puis re-synthétisés au cours des 7 à 8 heures suivantes. La dégradation des sucres de réserves fournit du carbone supplémentaire à la levure donc potentiellement de

l'énergie ; cependant la quantité d'énergie fournie par la dégradation de ces réserves est 26 fois supérieure à la demande énergétique calculée pour exporter les protons hors du cytosol (Poilpre, 2002). La réponse au stress acide en terme de dégradation de réserves intracellulaires semble disproportionnée par rapport à la demande énergétique. Une autre hypothèse purement basée sur une régulation physiologique serait que l'acidification du cytosol suite au stress acide provoquerait l'activation de la tréhalase et donc une dégradation des sucres de réserves (Valle et coll., 1986).

II.2.3. Aspect moléculaire d'un stress acide

Le génome de *S. cerevisiae* est constitué d'environ 6000 gènes (Goffeau et coll., 1996). Toutefois, après ré-annotation complète, ce nombre avoisinerait plus probablement les 5570 parmi lesquels, environ un millier correspondraient à des gènes essentiels (Wood et coll., 2001 ; Talla et coll., 2003).

Récemment, l'avancée des biotechnologies avec les analyses transcriptomiques et protéomiques a permis d'étudier et de comparer les changements dans les profils d'expression de la globalité des gènes et des protéines suite à différents stress tels que la pression osmotique (Rep et coll., 1999 ; Yale et Bohnert, 2001 ; Erasmus et coll., 2003), l'acide sorbique (Schüller et coll., 2004), le CO₂ (Aguilera et coll., 2005a), la température (Causton et coll., 2001) et une forte pression hydrostatique (Fernandes et coll., 2004).

Concernant l'étude du stress acide sur la levure, il existe de nombreuses données obtenues grâce à l'analyse du transcriptome, du protéome ou par des méthodes de criblage de mutants. Les résultats sont trop hétérogènes pour pouvoir distinguer une cible précise des acides faibles sur la levure. Ainsi, une étude réalisée sur des mutants de la collection EUROSCARF (mutants de délétion diploïdes homozygotes), en réponse à l'acide sorbique montre que 237 mutants sont sensibles à l'acide et que 34 montrent une croissance supérieure à celle de la souche sauvage. Par ailleurs, un nombre important de mutants sensibles au stress oxydatif (mutants mitochondriaux) sont sensibles à l'acide sorbique et une inhibition importante est aussi observée pour des mutants déficients dans la synthèse de l'ergostérol suite à un stress acide (Mollapour et coll., 2004).

Par ailleurs, un couplage de l'analyse transcriptomique et protéomique montre que dans la première analyse, 94 gènes voient leur expression augmenter après un stress acide et 72 gènes ont leur expression diminuée. L'analyse protéomique couplée ne donne que 10 protéines surexprimées et 3 sous exprimées. Une seule protéine est commune aux deux méthodes, Hsp26p (de Nobel et coll., 2001), protéine de stress thermique qui sera discutée dans le paragraphe II.2.3.b. Cependant, si toutes les analyses de la littérature sont regroupées, quelques voies de signalisation et protéines sont communes.

II.2.3.a. Voie de signalisation impliquée dans la réponse générale au stress

L'analyse du transcriptome de *S. cerevisiae* en réponse à différentes conditions de stress (thermique, oxydatif, osmotique, carence en azote ou en glucose, limitations nutritionnelles) a permis de mettre en évidence l'existence d'un réseau de gènes activés de façon concomitante quelle que soit la nature du stress (Gasch et coll., 2000 ; Causton et coll., 2001). L'activation de ces gènes constitue la réponse générale au stress qui serait principalement médiée par les facteurs de transcription Msn2p/Msn4p (Gasch et coll., 2000). La réponse commune à tous les stress correspond à un changement d'expression d'environ 300 gènes dont 60 % ne sont pas caractérisés (Gasch et coll., 2000).

II.2.3.b. Induction de protéines spécifiques

Plusieurs protéines spécifiques d'une réponse à un stress acide, interviennent dans la réponse de la levure : des protéines de la membrane plasmique, Pdr12p (Piper et coll., 1998), Azr1p (Tenreiro et coll., 2000), et Yrs1p (Cui et coll., 1996) et des protéines de stress thermique, Hsp30p (Piper et coll., 1997) et Hsp26p (de Nobel et coll., 2001).

Protéines membranaires de résistance aux drogues

Trois protéines de la membrane plasmique ont été identifiées comme étant surexprimées suite à un stress acide et sont considérées comme jouant un rôle principal dans la réponse à l'acide : Pdr12p, Azr1p et Yrs1p (Piper et coll., 1997 ; Tenreiro et coll., 2000 ; Cui et coll., 1996). La première et la dernière protéine sont des transporteurs de type « ABC » (« ATP Binding Cassette ») utilisant l'ATP comme source d'énergie ; Azr1p est décrite comme une protéine appartenant à la « major facilitator superfamily proteins » (MFS). Les MFS sont des perméases possédant entre 12 et 14 segments membranaires avec une boucle cytoplasmique riche en histidines. Le transfert à travers ces systèmes se fait par la force proton motrice ou par le gradient chimioosmotique.

Pdr12p est la protéine la plus largement décrite dans la littérature comme étant surexprimée suite à un stress acide (Piper et coll., 1997, 1998, 2001 ; Holyoak et coll., 1999). Cette protéine est composée de 511 acides aminés et son poids moléculaire est de 171 kDa.

Sans la présence d'acide, les cellules cultivées à pH 7 expriment une faible quantité de cette protéine. De faibles pH induisent une production plus élevée de Pdr12p ; ainsi à pH 4,5, le niveau de l'expression de *PDR12* est dix fois plus élevé qu'à pH 7 (Piper et coll., 1998). En revanche, dès qu'un stress acide est provoqué, le gène *PDR12* est fortement exprimé. La surexpression de cette protéine est induite par des acides faibles contenant 3 à 8 atomes de carbone (Holyoak et coll., 1999 ; Schüller et

coll., 2004). Toutefois, l'acide acétique, co-produit de la levure ne permet pas l'induction de cette protéine (Hatzixanthis et coll., 2003).

Le gène *PDR12* intervient à un niveau moindre dans d'autres gammes de stress tels que le choc thermique, éthanol, osmotique ou oxydatif. Cela suggère l'existence d'un système spécifique pour déclencher une réponse au stress acide (Piper et coll., 1998). Le mécanisme d'induction de l'expression de la protéine Pdr12p n'est pas connu mais il pourrait être une concentration intracellulaire en anions élevée (Piper et coll., 2001), agissant directement sur le facteur de transcription. Récemment, un facteur de transcription participant à l'induction de Pdr12p a été identifié comme étant War1p (Kren et coll., 2003 ; Schüller et coll., 2004).

Les deux autres protéines Azr1p et Yrs1p ne sont que très peu décrites dans la littérature et des mutants délétés pour ces gènes ont été utilisés pour montrer leur implication dans la réponse à un stress acide. Ces résultats n'ont pas été confirmés par aucune analyse transcriptomique ou protéomique.

Néanmoins, il semblerait que Azr1p contribue à la réponse à un stress aux acides acétique et propionique mais n'interviendrait pas avec les acides sorbique et benzoïque (Tenreiro et coll., 2000). Cette protéine membranaire permettrait à la levure de lutter contre l'acide mais aucune explication de son mécanisme d'action n'est proposée dans la littérature.

Cui et coll. (1996) ont montré que des mutants délétés pour le gène *YRS1* sont sensibles à différents antibiotiques (révéromycine, tautomycine et leptomycine). Par ailleurs, ces mêmes mutants se montrent très sensibles aux acides acétique, propionique et benzoïque indépendamment du pH de la culture. Le mécanisme de cette protéine n'est pas connu mais elle pourrait participer directement dans le transport actif des anions organiques toxiques à travers la membrane plasmique comme transporteur multispécifique pour exporter ou compartimenter des molécules toxiques (Cui et coll., 1996).

Protéines de stress thermique Hsp30p et Hsp26p

Deux protéines de stress thermique sont fortement induites suite à un stress acide : Hsp30p et Hsp26p (Piper et coll., 1997 et de Nobel et coll., 2001).

Hsp30p est induite par plusieurs stress incluant l'exposition à une forte température, à l'éthanol, aux acides faibles et à une forte concentration de glucose (Gasch et coll., 2002 ; Alexandre et coll., 2001 ; Piper et coll., 1997 ; Erasmus et coll., 2003). Il s'agit d'une protéine de la membrane plasmique, qui est un régulateur (inductible au stress) de l'H⁺-ATPase plasmique. Hsp30p a un rôle de conservation d'énergie, limitant la consommation excessive d'ATP par l'H⁺-ATPase plasmique lors d'un stress (Piper et coll., 1997).

Hsp26p est une protéine de stress thermique et chaperonne (de Nobel et coll., 2001). Cette protéine est induite suite à de nombreux stress : choc osmotique, thermique, et acide (Rep et coll., 2000 ; Yale et Bohnert, 2001 ; Causton et coll., 2001 ; Carmelo et Sa-correia, 1997 ; de Nobel et coll., 2001). Son rôle serait de préparer les protéines dénaturées pour la dégradation ou pour un réarrangement tridimensionnel. Ce qui amène de Nobel et coll. (2001) à proposer que l'action principale de l'acide sorbique serait alors une dénaturation des protéines intracellulaires.

Il existe des points communs entre la réponse à un stress acide et à un stress thermique comme par exemple la surexpression de protéines de stress thermique ou la suractivité de l'H⁺-ATPase (Viegas et coll., 1995). Par ailleurs, une exposition de la levure à un premier stress peut provoquer une résistance à un deuxième stress identique ou différent. Ainsi, l'acquisition de l'osmotolérance peut provoquer la thermotolérance mais la réciproque n'est pas vraie (Trollmo et coll., 1988 ; Lewis et coll., 1995). Puisque les mécanismes mis en place sont similaires, on peut se demander si une première exposition à un stress acide permet d'améliorer la thermotolérance de la levure. L'effet sur la thermotolérance d'un pré-traitement à l'acide est fortement dépendant du pH, de l'acide utilisé et de la présence ou non de glucose (Carmelo et coll., 1998). Ce qui explique pourquoi dans la littérature, les résultats de la thermotolérance acquise suite à un stress acide sont variés. En effet, dans un premier temps van Uden (1984) a décrit que l'acide sorbique n'avait aucune influence sur une probable tolérance ultérieure à un stress thermique. En revanche, ce même acide provoque l'acquisition de la thermotolérance chez *S. cerevisiae* pour Coote et coll. (1991) et pour Cheng et Piper (1994). Cependant, ces auteurs sont en désaccord sur les pH optimum pour l'acquisition de la thermotolérance, puisque pour les premiers cités, la thermotolérance observée est plus importante à des pH élevés alors que pour les seconds, elle est observée à des pH plus faibles. Néanmoins, si les cellules sont soumises à un stress acide trop important (50 mM d'acide acétique à pH 3,5), la thermotolérance n'est pas induite (Carmelo et coll., 1998). Il n'est jamais décrit dans la littérature si un stress thermique permettait d'avoir une tolérance à l'acide par la suite.

Des besoins auxotrophiques exacerbent l'effet des acides

Le « background » génétique de la levure peut avoir une forte influence sur les niveaux des acides faibles aptes à inhiber la croissance. Les besoins auxotrophiques pour les acides aminés aromatiques exacerbent l'effet de l'acide faible sur les levures ; des mutations telles que *Δtrp1* (gène qui code pour une isomérase qui participe à la biosynthèse du tryptophane) rendent *S. cerevisiae* beaucoup plus sensible aux acides faibles que la souche sauvage (Bauer et coll., 2003). Ce phénomène peut s'expliquer par une inhibition des transporteurs des acides aminés par les acides faibles. Ainsi, à pH 4,5,

pour des cellules compétentes dans la synthèse des acides aminés aromatiques, la MIC pour l'acide sorbique est proche de 4 mM. Pour des souches auxotrophes pour les acides aminés aromatiques, la MIC est comprise entre 0,5 et 2 mM (Bauer et coll., 2003).

II.2.4. Effets d'un stress acide selon les conditions de culture

II.2.4.a. La présence d'oxygène, un stress supplémentaire ?

Des cultures de *S. cerevisiae* sont plus résistantes à un choc thermique en absence d'oxygène (Davidson et coll., 1996) ce qui fait de l'oxygène un facteur environnemental à prendre en compte lors d'un stress chez la levure.

Les premières études comparatives sur la présence ou non d'oxygène avec des acides organiques montrent qu'en conditions anaérobies, le taux de croissance et la MIC sont plus faibles qu'en conditions aérobies (Warth, 1991). Ces résultats ne sont pas corroborés par Fleet (1992) qui montre que la sensibilité de *S. cerevisiae* aux acides faibles est nettement supérieure en présence d'oxygène qu'en conditions anaérobies. La présence d'acides organiques (acides sorbique, benzoïque et propionique), en conditions aérobies, augmente la production endogène de radicaux libres et donc les agents conservateurs exercent une forte action pro-oxydante sur des cellules aérobies (Piper, 1999). Grâce à cette observation, une autre protéine nécessaire dans la résistance de la levure aux acides organiques a été mise en évidence par la réalisation de mutants du gène *Sdp2*. Ces mutants montrent une sensibilité accrue aux acides faibles (Piper et coll., 1999). La protéine codée par ce gène, SOD2p, est une superoxyde dismutase qui catalyse la réaction suivante: $O_2^{\bullet} + O_2^{\bullet} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Ravindranath et Fridovich, 1975). Naturellement présente, cette enzyme permet donc à la levure de diminuer le contenu intracellulaire en radicaux libres, cependant, en son absence, les acides faibles provoquent une accumulation accrue de radicaux libres sans possibilité de transformation.

Par ailleurs, les acides sorbique et benzoïque sont mutagènes envers le génome mitochondrial de la levure et à des concentrations non inhibitrices pour cette dernière (Piper, 1999). Une observation identique avait déjà été proposée pour la réponse à un stress thermique en présence d'oxygène. En effet, en aérobiose, le stress thermique provoque une augmentation de la rupture de la membrane mitochondriale ; celle-ci est 100 fois plus faible en conditions anaérobies (Davidson et Schiestl, 2001).

II.2.4.b. Le glucose : une source d'énergie nécessaire ?

La présence de glucose semble être nécessaire pour lutter contre les effets des acides, sous forme d'énergie disponible pour la cellule. En effet, l'augmentation de la concentration en acide benzoïque intracellulaire est moins importante si le glucose est présent dans le milieu de culture (Warth, 1988). En absence de glucose, les cellules

adaptées ou non adaptées (adaptation décrite dans le § II.3.) montrent la même accumulation d'acide benzoïque intracellulaire, accumulation relativement rapide. Dès l'ajout de glucose, la concentration d'acide intracellulaire des cellules adaptées diminue fortement (Warth, 1977). Il semblerait que la présence de glucose permette d'avoir une source d'énergie qui est nécessaire pour excréter l'acide benzoïque hors de la cellule. Ce phénomène d'extrusion n'est pas observé en présence d'éthanol (Henriques et coll., 1997). Par ailleurs, comme décrit dans le paragraphe II.2.1.b., la présence de glucose permet de réguler plus rapidement le pH_i (Arneborg et coll., 2000).

II.2.5. Effet des acides sur la capacité fermentaire de la levure

Pour identifier l'impact des acides faibles sur la capacité fermentaire de *S. cerevisiae*, des cellules sont prélevées en phase de croissance exponentielle ou linéaire (oxydatif ou respiro-fermentaire) puis placées dans des conditions similaires à celles de l'utilisation ultérieure de la levure, comme par exemple des conditions de panification. Le propionate de calcium provoque une diminution du pouvoir fermentaire de la levure à de faibles concentrations (0,2 g d'agent conservateur pour 100 g de farine). Cette diminution de la capacité fermentaire est proportionnelle à la quantité d'agent conservateur ajoutée (Patisson et von Holly, 2001). L'acide benzoïque a le même effet et diminue la capacité fermentaire de 30 % pour 2 mM d'acide (Ferreira et coll., 1997). Néanmoins, il semblerait que des levures exposées à l'acide pendant leur phase de croissance montrent une diminution du pouvoir panifier moindre par rapport à des cellules qui n'ont jamais été en contact avec l'acide (Ferreira et coll., 1997).

II.2.6. Le CO₂ peut-il être considéré comme un acide faible ?

Le dioxyde de carbone est un produit du métabolisme cellulaire et est connu pour être inhibiteur de la croissance des levures. Il est utilisé comme agent antimicrobien à de fortes surpressions (10 MPa, Erkmen, 2003). Sa non-toxicité pour le consommateur, son élimination facilitée, son large spectre d'action et le fait qu'il préserve les qualités organoleptiques des aliments en font un agent antimicrobien de choix.

L'inhibition de la croissance des levures est observée lorsque la fraction molaire en CO₂ devient supérieure à 20 % dans les gaz d'entrée pour des cultures de type fed-batch. L'inhibition devient totale pour une teneur de 50 % de CO₂, ce qui correspond à une concentration en CO₂ dissous de $1,6 \cdot 10^{-2}$ M (Chen et Gutmanis, 1976). La présence de CO₂ dans les gaz d'entrée provoque une réduction du rendement en biomasse supérieure en présence d'oxygène à celle obtenue en anaérobiose, respectivement de 25 et 10 % (Aguilera et coll., 2005a). Cette observation indique que le métabolisme oxydatif est plus sensible au CO₂ que le métabolisme fermentaire. Conformément à cette observation, le nombre de gènes dont l'expression varie suite à une augmentation de CO₂ dans les gaz d'entrée est plus élevé en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies.

Beaucoup de gènes impliqués dans des fonctions mitochondriales ont montré une surexpression des transcrits suite à une exposition à des concentrations élevées en CO₂ (Aguilera et coll., 2005a). Ceci est en accord avec l'effet découplant du CO₂ et/ou du bicarbonate intracellulaire sur la membrane interne mitochondriale prouvée in vitro (Lodeyro et coll., 2001). D'autres gènes ont montré une réponse transcriptionnelle significative à une concentration élevée en CO₂ tels que *NCE103* (codant pour une anhydrase carbonique), *PCK1* (codant pour une PEP carboxykinase) et des gènes de la famille des IMD (codant pour des isoenzymes de l'inosine monophosphate déshydrogénase) (Aguilera et coll., 2005a). Le premier gène cité montre une importante sous expression alors que les autres montrent une surexpression après une exposition à de fortes concentrations de CO₂.

Le CO₂ est toujours considéré comme molécule en tant que telle mais n'est que très rarement assimilé à un acide faible. Or, l'effet inhibiteur pourrait provenir du CO₂ dissous qui peut être considéré comme un acide faible puisqu'il lui est associé deux constantes d'acidité. En tant qu'acide, il existe dans le milieu de culture sous différentes formes (Figure 11). Ainsi, le CO₂ est spontanément hydraté en H₂CO₃, qui se dissocie ensuite en bicarbonate et un proton. Le proton est extrudé par l'H⁺-ATPase de la membrane plasmique, ce qui augmente le pH intracellulaire. L'acide carbonique est supposé diffuser librement à travers la membrane plasmique contrairement au bicarbonate. A un pH intracellulaire élevé, la dissociation de l'acide carbonique est déplacée dans le sens de la production du bicarbonate. Puisque le bicarbonate ne peut pas diffuser, il reste à l'intérieur de la cellule, générant une perturbation dans le potentiel électrochimique. L'entrée des ions potassium dans le cytosol par un système antiport permet de rétablir ce potentiel. Cette théorie est supportée par Peña (1975) qui observe une entrée massive d'ions potassium à l'intérieur de la cellule suite à un bullage de CO₂ pur dans le réacteur sur des cultures continues sous atmosphère d'azote. Par ailleurs, il confirme que le bicarbonate est un facteur non seulement capable d'augmenter l'entrée de cations dans la cellule mais il participe aussi à la rétention des ions dans la cellule. De plus, il semblerait que le bicarbonate s'accumule dans la vacuole (Lopez et coll., 1999).

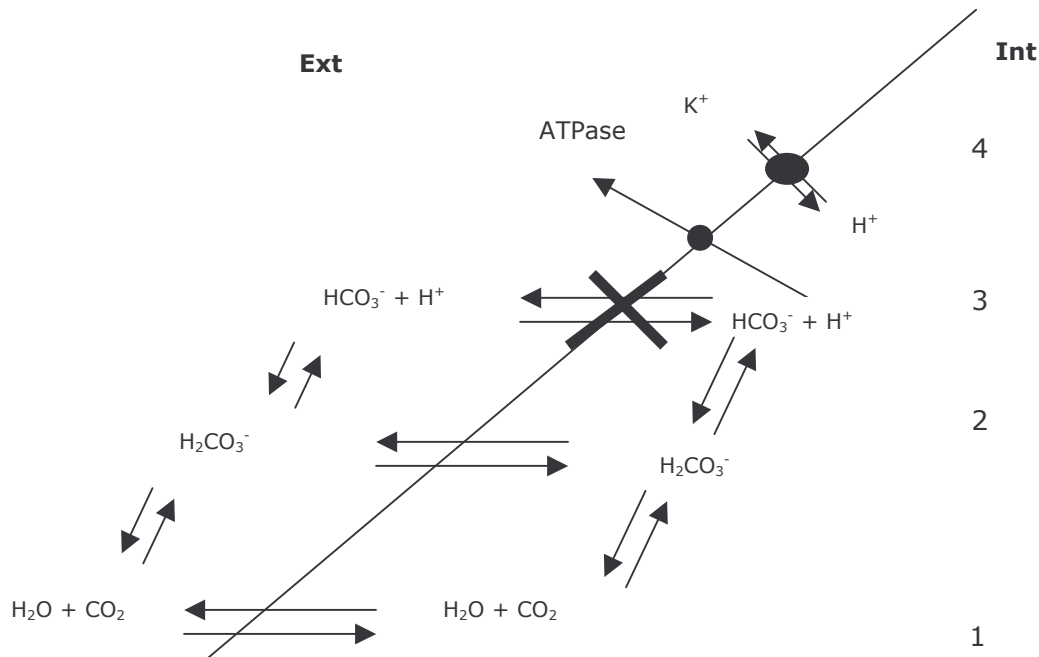


Figure 11 : Schéma représentant les différentes espèces du dioxyde de carbone selon les équilibres ioniques (Lopez et coll., 1999). (1) : le CO_2 est spontanément hydraté en H_2CO_3^* , (2) : H_2CO_3^* se dissocie en bicarbonate et en proton, (3) : l' H^+ -ATPase extrude le proton, (4) : entrée de potassium pour neutraliser le bicarbonate intracellulaire.

Par ailleurs, Lopez et coll. (1999) ont montré que l'addition d'acide propionique (30 mM) à des cellules cultivées sur glucose provoquait un efflux de CO_2 hors des cellules (31 % du CO_2 initial). Les auteurs pensent que ce phénomène est dû à un rééquilibrage entre les deux acides faibles à l'intérieur de la cellule.

Ces études montrent que le CO_2 , toujours présent dans les cultures et potentiellement actif, doit être considéré comme un acide faible.

II.3. Mécanismes de résistance aux acides mis en place par la levure

Les agents conservateurs posent un problème de résistance avec un développement indésirable de micro-organismes malgré la présence de ces agents. Cette résistance aux agents conservateurs peut être un avantage ou un inconvénient selon l'utilisation ultérieure du produit. En effet, pour des raisons de sécurité alimentaire, la prolifération de micro-organismes dans les aliments est un important problème. En contradiction avec ce phénomène, la résistance de la levure de boulangerie est recherchée ; en effet, l'inhibition de leur croissance et de leur capacité fermentaire

devient un inconvénient majeur puisqu'il s'agit de leur fonction principale dans le processus de panification.

De nombreux micro-organismes sont dits « résistants » aux acides faibles et, des micro-organismes avec une résistance à un agent conservateur donné comme l'acide benzoïque peuvent se montrer résistants à d'autres agents comme les acides sorbique et acétique (Fleet, 1992).

II.3.1. Définition de la résistance ou adaptation à un acide faible

La résistance aux acides faibles peut se définir de deux façons distinctes : la première définition, la plus couramment rencontrée dans la littérature, concerne la capacité de la levure à reprendre sa croissance suite à un stress acide après une phase de latence plus ou moins longue. La deuxième définition est perçue comme une augmentation de la tolérance à un agent conservateur donné, due à une précédente exposition à l'acide (Warth, 1988).

Zygosaccharomyces bailii est la première levure dont l'adaptation aux acides faibles a été montrée et reste de loin la plus résistante (Warth, 1977 ; Thomas et Davenport, 1985). Un mécanisme de résistance similaire a été montré chez d'autres espèces et notamment chez *S. cerevisiae* (Warth, 1988).

Cette adaptation au stress peut être corrélée à l'induction de protéines membranaires, à des mécanismes de compétition au niveau des transporteurs spécifiques ou à une adaptation physiologique globale de la cellule relevant de l'énergétique cellulaire. L'acquisition de la résistance se fait par une première exposition aux acides faibles ; les cellules obtenues, cellules nommées « adaptées » sont plus tolérantes à de fortes concentrations du même acide ou à d'autres acides lors d'une deuxième exposition.

II.3.2. Régulation métabolique plus efficace et dégradation des acides, exemple de *Z. bailii*

Z. bailii possède la capacité de survivre dans des environnements dits « stressants » tels que de faibles pH, de fortes concentrations en éthanol et de fortes pressions osmotiques (Ingram, 1960 ; Pitt, 1974). Elle est aussi connue pour sa résistance aux acides faibles, ainsi *Z. bailii* est capable de croître en présence de concentrations élevées en acide telles que 0,6 g.L⁻¹ d'acide benzoïque ou sorbique ou 2 % d'acide acétique et à des pH inférieurs aux pKa de ces acides (Pitt, 1974). Par ailleurs, cette levure est celle dont les MIC sont les plus élevées (Tableau 2, p. 41). Une première exposition à l'acide benzoïque dans une culture à une concentration inférieure à la MIC permet d'augmenter la résistance de la levure *Z. bailii* à une exposition ultérieure à l'acide, et la MIC est multipliée par 2 (Warth, 1977).

II.3.2.a. Mécanismes proposés pour expliquer la tolérance de *Z. bailii*

Différentes hypothèses sont proposées pour expliquer cette tolérance aux acides chez *Z. bailii* :

- *Z. bailii* dégrade les acides acétique, sorbique et benzoïque en conditions aérobies (Sousa et coll., 1996 ; Mollapour et Piper, 2001a). En ce qui concerne l'acide benzoïque, le gène intervenant dans cette dégradation a été récemment découvert (*ZbYME2*), ce gène code pour une mono-oxygénase mitochondriale, la 4-hydroxybenzoate de la voie du β -adipate impliquant l'hydroxylation du benzoate en 4-hydroxybenzoate (Mollapour et Piper, 2001a). Ce gène n'est pas présent chez *S. cerevisiae*, mais inséré dans le génome de cette dernière, il lui confère la possibilité de dégrader les acides sorbique et benzoïque (Mollapour et Piper, 2001b).

- La membrane plasmique de *Z. bailii* deviendrait moins perméable aux acides faibles avec des interactions au niveau des régions hydrophobes de la membrane et donc permettrait de réduire la concentration en acide intracellulaire (Leyva et Peinado, 2005).

- L'entrée de l'acide dans la cellule provoque une entrée concomitante de cations K^+ chez *Z. bailii* par des transporteurs de faible affinité qui ne sont pas inhibés à de faibles pH exocellulaires contrairement aux transporteurs présents chez *S. cerevisiae* (Demidchick et coll., 2005).

- La forme anionique de l'acide est extrudée hors de la cellule par un système de transport actif pour maintenir une concentration en acide intracellulaire faible en présence de glucose (Warth, 1988 ; Henriques et coll., 1997).

- Les protons sont activement pompés hors de la cellule par des ATPases, ce qui explique que le pH_i ne diminue pas suite à un pulse d'acide contrairement à *S. cerevisiae* qui voit son pH_i fortement diminuer (Warth, 1988 ; Verduyn et coll., 1992a ; Arneborg et coll., 2000). Les deux derniers mécanismes demandent beaucoup d'énergie qui est alors indisponible pour la synthèse anabolique, ce qui explique la réduction conséquente du rendement en biomasse observée.

II.3.2.b. Différences entre *Z. bailii* et *S. cerevisiae*

La première explication proposée pour expliquer la différence de la tolérance aux acides entre ces deux levures est la capacité de *Z. bailii* à dégrader les agents conservateurs (acides sorbique et benzoïque) alors que *S. cerevisiae* ne possède pas cette aptitude. Cependant, la différence de tolérance à l'acide ne peut pas s'expliquer par cette simple dissimilitude puisque *S. cerevisiae* est capable de dégrader l'acide propionique et possède une MIC inférieure à celle de *Z. bailii* (Tableau 2, p. 41).

Par ailleurs, une différence de coefficient de maintenance entre les deux souches ne semble pas être en cause pour expliquer la dissimilitude de tolérance entre les deux levures avec un coefficient de maintenance calculé selon l'équation suivante.

$$q_{glucose} = m + \frac{\mu}{Y_{glucose}^{max}} \quad \text{(Equation 6)} \quad \text{avec } Y_{glucose}^{max} \text{ le rendement théorique maximal en}$$

absence de maintenance.

Pour *Z. bailii* cultivée en cultures continues anaérobies, la présence d'acide benzoïque provoque une augmentation du coefficient de maintenance de 1 mmol d'ATP.g⁻¹.h⁻¹ en absence d'acide à 5 mmol d'ATP.g⁻¹.h⁻¹ en sa présence (Leyva et Peinado, 2005). Ces maintenances sont similaires à celles obtenues pour *S. cerevisiae* dans des conditions de culture identiques en présence d'acide propionique (Verduyn et coll., 1990b ; 1992a). Néanmoins, *Z. bailii* cultivée en cultures continues anaérobies possède un Y_{ATP} de 20 g.mol⁻¹ qui est identique en présence ou non d'acide (Leyva et Peinado, 2005). Pour *S. cerevisiae*, la présence d'acide dans le substrat d'alimentation provoque une diminution du Y_{ATP} de 14 g. mol⁻¹ en absence d'acide à 9,6 g.mol⁻¹ avec 7 mM d'acide propionique (Verduyn et coll., 1990b).

Comme nous l'avons précédemment vu, *S. cerevisiae* suite à un stress acide induit de nombreuses protéines membranaires, or *Z. bailii* ne présente pas un changement majeur dans la composition protéique de sa membrane plasmique ; la résistance ne semble pas provenir d'une induction différente de protéines membranaires spécifiques (Piper et coll., 2001).

Cependant, *Z. bailii* n'est pas plus résistant que *S. cerevisiae* à tous les acides. L'inhibition de la fermentation est plus importante pour *S. cerevisiae* en présence des acides propionique, acétique, butyrique et l'inhibition est identique pour les deux levures avec les acides caproïque, caprylique et sorbique (Ferreira et coll., 1997).

L'accumulation de cations est un facteur important dans l'adaptation aux acides faibles et *Z. bailii* et *S. cerevisiae* montrent des réponses adaptatives suite à un stress acide similaires au niveau des transporteurs cationiques de la membrane plasmique (Macpherson et coll., 2005).

D'autres levures sont capables de dégrader l'acide sorbique et provoque la contamination de denrées alimentaires. Ainsi, *Zygosaccharomyces rouxii* et *Debaryomyces hansenii* produisent du 1,3-pentadiène en présence d'acide sorbique. Cette production est proportionnelle à la quantité initiale d'acide sorbique (Casas et coll., 2004).

II.3.3. Acquisition de fonctionnalités nouvelles pour *S. cerevisiae*

Z. bailii apparaît comme la levure montrant la meilleure résistance aux acides faibles, néanmoins, l'augmentation de la résistance aux acides après une première exposition à l'acide benzoïque, tout d'abord observée chez *Z. bailii* est commune à d'autres espèces et notamment à *S. cerevisiae*. Cet effet paraît s'appliquer à des acides

faibles lipophiles de faible poids moléculaire incluant les acides sorbique, acétique, benzoïque et propionique (Warth, 1989a). Il existe un mécanisme commun de résistance aux acides faibles ; ainsi, sur les cellules dites « adaptées », une corrélation entre la résistance à l'acide propionique et à l'acide acétique est observée (Warth, 1989a). Toutefois, l'acide acétique ne peut pas être mis comme inducteur car la cellule ne le reconnaît pas comme métabolite hétérologue puisqu'il s'agit d'un composé métabolisé par la cellule elle-même (Piper et coll., 2001). *S. cerevisiae* montre une résistance aux acides faibles différente de celle de *Z. bailii* avec une acquisition de fonctionnalités nouvelles, telles que l'induction de protéines spécifiques et la dégradation de certains acides faibles.

II.3.3.a. Protéines spécifiques

Comme décrit précédemment, la levure met en place de nombreux systèmes afin de lutter contre les effets de l'acide. Dans la littérature, l'induction de Pdr12p reste une preuve de la résistance de la levure à différents acides faibles : acides sorbique, benzoïque, propionique et acétique (Piper et coll., 1998). Cette protéine est caractérisée structuellement par un motif de liaison à l'ATP appelé ATP-Binding cassette (ABC) et possède une activité ATPasique intrinsèque.

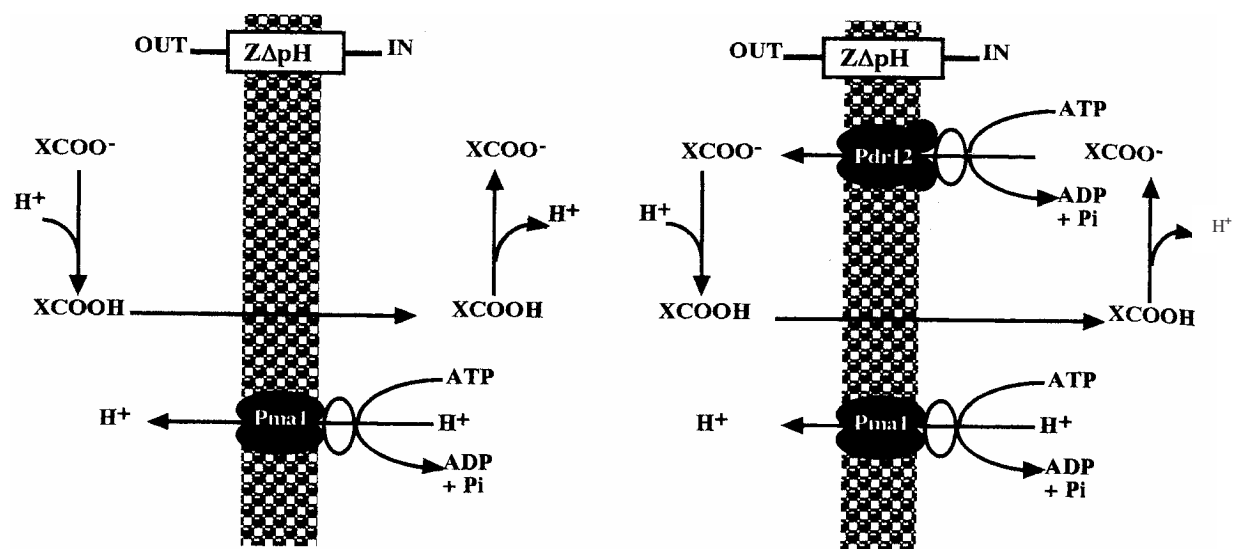


Figure 12 : Modèle schématisé de l'action potentielle de Pdr12p pour aider *S. cerevisiae* à contrecarrer les effets inhibiteurs des acides organiques solubles dans l'eau (Piper et coll., 2001). Chez les cellules adaptées ou non adaptées, les acides faibles entrent dans la cellule par diffusion simple. Chez les cellules non adaptées (a), la concentration en XCOOH à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule doit être la même, gouvernée par le pH de part et d'autre de la membrane plasmique et par la constante de dissociation de l'acide. Des pH relativement élevés dans le cytosol provoquent une dissociation de l'acide sous forme d'anions (XCOO^-), une forme qui est relativement imperméable à la membrane et donc qui va s'accumuler dans la cellule. Chez les cellules adaptées (b), il est nécessaire d'évoquer une limitation de l'entrée diffusionnelle de l'acide faible dans la cellule. La différence de potentiel électrochimique à travers la membrane est maintenue par l' H^+ -ATPase (Pma1p) qui catalyse l'extrusion des protons, tandis que Pdr12p expulse les anions hors du cytosol.

Pdr12p transporte les anions du cytosol vers l'environnement extérieur, en utilisant une grande quantité d'ATP. En même temps, l'activité de l'H⁺-ATPase est augmentée et l'énergie venant de l'hydrolyse de l'ATP est utilisée au transport des protons accumulés dans le cytosol dans le but de maintenir une homéostasie (Piper et coll., 2001) (Figure 12). Cependant, il semblerait que les levures évitent un cycle futile d'entrée diffusionnelle et d'extrusion active des acides organiques par l'induction de cette protéine. Sans cette limitation, l'acide peut diffuser à travers la membrane aussi vite qu'il est pompé hors de la cellule dans un cycle futile énergétiquement très coûteux. *S. cerevisiae*, adaptée aux acides faibles peut maintenir une distribution d'acide benzoïque intracellulaire et extracellulaire qui n'est pas à l'équilibre. Cela indique que l'induction d'un système adapté peut réduire le pool intracellulaire d'acide faible. Mais, il paraît impossible que seule l'extrusion des acides faibles soit suffisante pour le réaliser et par conséquent, les cellules adaptées restreindraient l'entrée diffusionnelle des acides faibles à travers l'enveloppe cellulaire. Les détails du mécanisme sont principalement inconnus mais il a été établi que les mannoprotéines de la paroi cellulaire peuvent limiter la porosité de la paroi de la levure (Piper et coll., 2001).

Bien que Pdr12p soit le mécanisme principal d'action conférant la résistance à l'acide faible, ce n'est pas le seul paramètre de la résistance puisqu'un mutant *Δpdr12* peut faire face à l'acide et continuer à croître à de faibles concentrations d'agents conservateurs. Il semblerait que l'adaptation aux acides faibles provienne d'une réponse plus globale de la levure avec notamment, l'action combinée de protéines membranaires telles que l'H⁺-ATPase, Azr1p et de Yrs1p (Piper et coll., 2001).

II.3.3.b. Dégradation de l'acide propionique

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs levures sont capables de dégrader les agents conservateurs, ce qui les rend plus résistantes à la présence d'acide dans le milieu de culture. *S. cerevisiae* est incapable de dégrader les acides sorbique et benzoïque mais une voie de métabolisation de l'acide propionique a été découverte pour cette levure (Pronk et coll., 1994).

Chez les micro-organismes procaryotes, la métabolisation de l'acide propionique est décrite par trois voies distinctes : la voie du méthylmalonyl-CoA (Figure 13.a ; Wegener et coll., 1968), par l'acrylate (Evans et coll., 1993) et par la voie du méthylcitrate-CoA (Figure 13.b ; Gerike et coll., 1998).

La voie du méthylmalonyl-CoA n'est pas retrouvée chez les levures. En effet, une des enzymes clés de cette voie, la méthylmalonyl-CoA mutase, nécessite la vitamine B12 comme co-facteur (Wegener et coll., 1968) et *S. cerevisiae* n'est pas capable de synthétiser cette vitamine (Schneider et Stoinski, 1987 cité par Pronk et coll., 1994). Une voie alternative du métabolisme de l'acide propionique a été découverte chez *Yarrowia lipolytica* (Tabuchi et Uchiyama, 1975 ; Uchiyama et Tabuchi, 1982). Cette voie est

initée par la synthèse de 2-méthylcitrate à partir du propionyl-CoA et de l'oxaloacétate. Par une voie métabolique similaire aux réactions du cycle TCA, le 2-méthylcitrate est converti en 2-méthylisocitrate, qui est ensuite clivé en pyruvate et succinate (Figure 13.b).

Il semblerait que la principale voie de dégradation de l'acide propionique chez *S. cerevisiae* soit celle du 2-méthylcitrate (Pronk et coll., 1994). En cultures continues aérobies, lorsque de l'acide propionique (10 mM) est ajouté à la source de carbone (glucose) dans le milieu d'alimentation, il y a co-métabolisation des deux substrats ; le dosage de l'acide indiquant qu'il ne reste que 100 μ M dans le milieu sur les 10 mM introduits (Pronk et coll., 1994). Par ailleurs, cette co-métabolisation permet d'augmenter les rendements en biomasse et en protéines. Et si le ratio acide propionique-glucose dans l'alimentation est augmenté, l'activité de la 2-méthylcitrate synthase, une enzyme clé de la voie du 2-méthylcitrate du métabolisme de l'acide propionique augmente également (Pronk et coll., 1994). Dans la cellule, l'activation de l'acide en propionyl-CoA peut être réalisée par deux enzymes la propionyl-CoA synthase et l'acétyl-CoA synthase (Jones et Lipmann, 1955). Cette dernière apparaît comme l'enzyme essentielle qui réalise la première étape dans la voie de dégradation de l'acide propionique (Pronk et coll., 1994). Le propionyl-CoA est un des substrats de l'acétylcarnitine transférase et est importé dans la mitochondrie (Palmieri et coll., 1999). Le propionyl-CoA est ensuite dégradé dans la mitochondrie comme l'atteste la présence de la 2-méthylcitrate lyase (Icl2p) dans cet organite (Luttik et coll., 2000).

Il est aussi observé un changement morphologique cellulaire ; sur glucose, les levures sont isolées alors qu'en condition de co-métabolisation (glucose-acide propionique), les cellules sont sous forme d'agrégats (3 à 7 cellules, Pronk et coll., 1994).

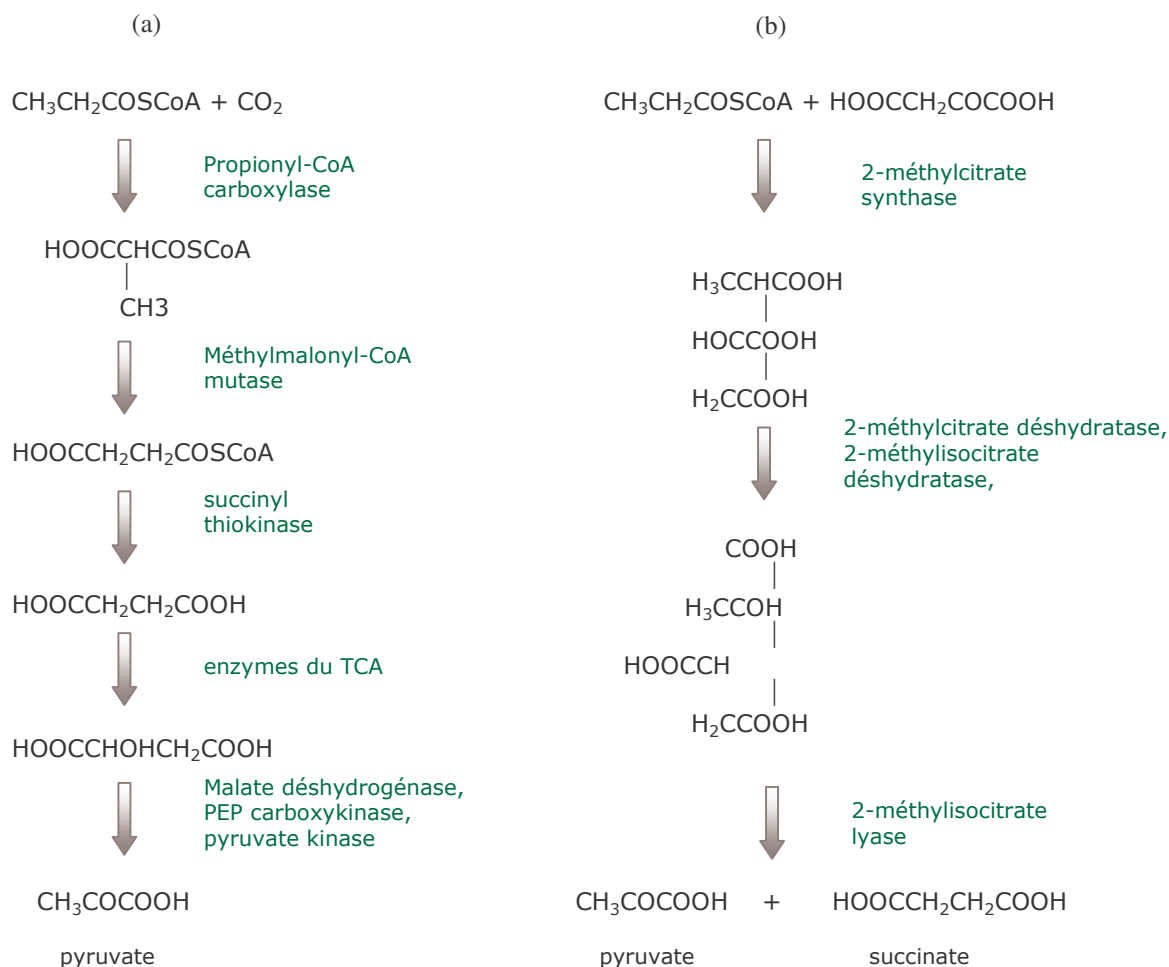


Figure 13 : Voies de dégradation de l'acide propionique. (a) voie du méthylmalonyl-CoA, le produit de dégradation est le pyruvate ; (b) voie du 2-méthylcitrate, les produits de dégradation sont le pyruvate et le succinate (Pronk et coll., 1994).

II.3.3.c. Changements de la composition membranaire

La tolérance de *S. cerevisiae* à certains stress a été corrélée à un changement de la composition membranaire. Ainsi, pour des cultures aérobies, les levures sont plus tolérantes à la température et à un stress oxydatif si leurs membranes sont enrichies en acides palmitoléique et oléique (Steels et coll., 1994). Récemment, il a été montré que des levures exposées et adaptées à l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (herbicide) exhibent un changement de composition de la membrane plasmique (Viegas et coll., 2005). Une augmentation du degré de saturation des acides gras de la membrane plasmique a été observée, associée à une augmentation du pourcentage des acides stéarique et palmitique et à une diminution du pourcentage des acides palmitoléique et oléique. Ce changement permettrait à la membrane d'être moins perméable à l'acide faible. Ce résultat suggère que l'adaptation à l'acide impliquerait une augmentation du ratio acides saturés/insaturés dans la membrane plasmique à travers une expression

réduite du gène *OLE1* qui code pour une désaturase acide (Viegas et coll., 2005). Ce changement de composition membranaire a déjà été reporté pour un autre micro-organisme (*Z. rouxii*) reconnu comme un contaminant majeur des denrées alimentaires. En présence d'acide sorbique, la modification de la teneur de la membrane plasmique en acide oléique permet de diminuer la perméabilité membranaire et donc augmente la tolérance à l'acide (Golden et coll., 1994).

III. Pression osmotique de la levure

En plus de l'homéostasie du pH_i, la levure possède des mécanismes d'osmorégulation pour maintenir à une valeur constante la pression de turgescence, c'est à dire la différence entre la pression osmotique du cytosol et celle du milieu extérieur. Ces mécanismes agissent de manière à augmenter ou diminuer la pression osmotique intracellulaire lorsque la pression osmotique du milieu est modifiée. L'activation de systèmes d'exportation d'ions K⁺ est la réponse osmorégulatrice primaire à une tendance à l'augmentation de la pression de turgescence.

Un choc osmotique provoque l'arrêt de la croissance cellulaire. Cet impact rapide sur la prolifération des cellules peut s'expliquer par le fait que le traitement déshydrate la cellule par un procédé purement osmotique. Ce phénomène est très rapide et est en général terminé en 1 minute (Blomberg, 2000). La croissance cellulaire reprend après une période d'adaptation, dont la durée dépend de nombreux facteurs : concentration du soluté provoquant le stress, souche utilisée et phase de croissance (Blomberg, 1997 ; Blomberg et coll., 1988). Cependant, ce sont toujours les mêmes mécanismes que la cellule met en place : expulsion du cation Na⁺ (s'il s'agit d'un stress NaCl), production de glycérol et de tréhalose. Les levures s'adaptent à des variations environnementales d'osmolarité en ajustant l'activité de l'eau des membranes plasmiques, les flux d'ions, les niveaux de glycérol et donc en contrôlant leur osmolarité interne.

Dans le cas d'un stress acide, le maintien du ΔpH et la régulation de la pression de turgescence sont des objectifs qui deviennent mutuellement exclusifs avec l'augmentation de la concentration en acide faible dans le milieu. Alors que le maintien du ΔpH demande une accumulation intracellulaire croissante d'ions K⁺ en échange des protons exportés, le maintien de la pression de turgescence normale requiert l'exportations d'ions K⁺ afin d'empêcher l'augmentation de la pression intracellulaire.

Néanmoins, ce problème de pression osmotique suite à un stress acide n'a été que très rarement discuté dans la littérature alors que les effets du stress osmotique (sorbitol, sels ou forte concentration en glucose) sont largement décrits. Or, tous les mécanismes mis en place pour lutter contre un stress acide concordent vers une augmentation de la pression osmotique de la levure. La question est de savoir comment les cellules arrivent à réagir face à ces deux phénomènes (acidité et pression osmotique)

qui induisent des réponses contradictoires. Dans ce paragraphe, nous n'allons développer que les réponses qui potentiellement seraient liées entre un stress acide et un stress à forte pression osmotique.

III.1.1. Rôle du glycérol

La production de glycérol résulte de l'exposition des cellules à un stress osmotique. Il s'agit d'une réponse osmorégulatrice impliquant l'accumulation de glycérol pour régénérer les NADH comme précédemment décrit mais aussi pour maintenir la pression de turgescence, le volume cellulaire et pour protéger des fonctions cellulaires osmosensibles (Blomberg et Adler, 1992). Les niveaux de glycérol accumulé intracellulairement peuvent atteindre jusqu'à 50 % de la totalité du glycérol produit (Blomberg et Adler, 1989).

III.1.2. Rôle du tréhalose

Le tréhalose est connu pour s'accumuler intracellulairement suite à de nombreux stress comme la température, la limitation nutritionnelle (cf. § I.1.6.c.) mais aussi suite à un stress salin (Parrou et coll., 1997, Sharma, 1997). Il a un rôle d'osmolyte chez *E. coli* où il est produit pendant certaines étapes de l'osmoadaptation (Kempf et Bremer, 1998). Néanmoins, chez la levure, le rôle du tréhalose suite à un stress osmotique n'a pas été complètement défini mais il ne semble pas posséder le même que celui qu'il joue chez la bactérie. Plusieurs éléments interviennent en faveur d'une action du tréhalose dans l'osmoprotection, comme par exemple une forte sensibilité à de fortes osmolarités pour des mutants *Δtps2*, gène codant pour une enzyme participant à la synthèse du tréhalose, une mortalité importante suite à un stress osmotique pour des levures incapables de produire du tréhalose (Hounsa et coll., 1998). Cependant suite à un stress salin, le tréhalose ne s'accumule pas dans des proportions qui pourraient avoir un impact majeur sur les propriétés osmotiques de la levure (Olz et coll., 1993).

III.1.3. Les cations

L'entrée et la sortie d'ions de la cellule jouent un rôle important dans l'osmoadaptation chez la plupart des micro-organismes. Ainsi, *E. coli* active des systèmes pour l'entrée des K^+ dans la cellule suite à un stress à forte osmolarité dans le but d'accumuler l'ion comme osmolyte (Wood, 1999). Les levures contrôlent parfaitement la proportion intracellulaire de Na^+ et K^+ en exportant le premier et en faisant rentrer le second. Le transport de K^+ et Na^+ est réalisé soit par un transport actif couplé à l'hydrolyse de l'ATP soit via un antiport H^+ (Rodriguez-Navarro, 2000).

III.1.4. Aspect moléculaire d'un stress osmotique

L'analyse de l'expression globale du génome en utilisant la technologie des « puces à ADN » permet de révéler potentiellement l'ensemble des gènes qui sont exprimés dans des conditions données de croissance. Cette expression globale a été réalisée par plusieurs auteurs mais les études diffèrent à la fois dans la nature (sel ou sorbitol) et dans la concentration du composé provoquant le stress osmotique. Toutes les études se sont focalisées sur la première phase de réponse à un choc osmotique et aucune étude n'a exploré l'expression du génome sur des cellules se développant sur des milieux à forte osmolarité.

Causton et coll. (2001) ont listé 179 gènes dont l'expression varie suite à un stress au sorbitol ou à un sel et qui ne sont pas impliqués dans la réponse à d'autres types de stress (chaleur, peroxyde, acidité, alcalinité). Ce nombre de gènes est faible par rapport à celui obtenu dans la réponse à d'autres stress. Par ailleurs, ce changement dans l'expression des gènes n'est que transitoire, ce qui semble indiquer que des changements mineurs sont requis pour l'adaptation à l'hyper osmolarité. Néanmoins, le niveau de la surexpression de ces gènes est plus élevé suite à un choc osmotique que suite à d'autres stress notamment pour les gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation d'osmolytes internes incluant le glycérol et le tréhalose (Causton et coll., 2001).

Un autre mécanisme de la tolérance au sel est la séquestration des cations dans la vacuole. Le transport du Na^+ dans la vacuole est réalisé par la protéine Nhx1p, un antiport Na^+/H^+ localisé dans le compartiment pré-vacuolaire activé par une acidose cytoplasmique (Nass et Rao, 1998). Un stress au NaCl requiert une activité de l' H^+ -ATPase vacuolaire intacte ; des mutants délétés du gène codant pour cette protéine sont très sensibles à un choc osmotique alors que des mutants délétés pour la protéine ATP-synthase ne le sont pas. La nécessité de cette H^+ -ATPase vacuolaire est spécifique d'un choc au NaCl ; pour un stress au sorbitol, cette protéine n'est pas indispensable, ce qui prouve que cette protéine est importante dans les échanges entre cations. Les premiers mutants sont très sensibles au stress NaCl car ils ne sont pas capables de séquestrer les ions Na^+ et Cl^- dans la vacuole et donc permettent ainsi au Na^+ d'interagir avec des cibles du cytosol sensibles à ce sel (Hamilton et coll., 2002).

Les phénomènes observés suite à un choc osmotique sont similaires à ceux observés après un stress acide : rôle des sucres de réserves, rôle des cations, nécessité de la présence des H^+ -ATPase vacuolaire et/ou cytoplasmique. D'après ces observations, il semblerait que la levure suite à un stress acide doive aussi faire face à une difficulté de réguler sa pression osmotique.

IV. Conclusion

Les études réalisées se font essentiellement sur des levures cultivées en fioles d'Erlenmeyer ou en cultures continues. Généralement, les études réalisées en chémostat ont deux approches. La première consiste en l'analyse d'un état transitoire après un stress et dans ce cas, les dynamiques d'évolution de la culture sont fonctions des cinétiques de réaction et des dynamiques hydrauliques avec un renouvellement de la biomasse qui a subi le stress. La seconde approche consiste dans l'analyse d'un état d'équilibre en présence d'un effecteur couplé au substrat d'alimentation, la réponse consiste en une moyenne de la population en état d'équilibre qui masque les dynamiques de réponse. Le mode de culture de type fed-batch utilisé pour la production de biomasse ou de protéines hétérologues est directement corrélé à la concentration cellulaire et il est possible de maintenir un métabolisme purement oxydatif par une limitation du substrat sans production d'éthanol. Ce type de culture permet aussi de prévenir des problèmes de répression catabolique, de contrôler de nombreux paramètres tels que l'apport d'oxygène. Il permet aussi de travailler à forte concentration cellulaire voisine de 80-100 g.L⁻¹ et ainsi permet d'amplifier la réponse à un stress et les flux et donc de mieux quantifier la dynamique de la réponse. Il n'a jamais été réalisé la caractérisation des dynamiques de la réponse métabolique à des pulses d'acide avec la possibilité de quantifier les effets cumulatifs dans le temps et les durées caractéristiques impliquées dans les différents mécanismes mis en place par la levure. Par ailleurs, les analyses transcriptomiques de la littérature suite à un stress acide consistent en un point final après le stress, il n'est que très rarement observé les dynamiques des transcrits suite à un stress acide. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser cette stratégie de type fed-batch afin d'analyser et de quantifier les dynamiques au niveau des variables macroscopiques mais aussi au niveau des transcrits.

Matériel et Méthodes

I. Souche et milieux de culture

I.1. Souche

Le microorganisme utilisé est une souche industrielle commerciale de *Saccharomyces cerevisiae*.

I.2. Milieux de culture

I.2.1. Milieu riche

Le milieu riche est utilisé uniquement pour les précultures en tubes, sa composition est donnée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Composition du milieu riche utilisé lors des précultures pour 1 litre de milieu.

Composé	Quantité (g)
Extrait de levure	5
Bactopeptone	10
Glucose	10
NaCl	10
Eau distillée (qsp)	1 L

I.2.2. Milieu minimum

I.2.2.a. Milieu initial (pour les inocula et pour le démarrage de la culture)

Le milieu de culture est déduit de celui défini par Van Hoek et coll. (2000b). Le glucose est l'unique source de carbone. La solution saline est préparée avec de l'eau du réseau, le pH étant ajusté au pH de travail avec de l'acide phosphorique avant la stérilisation par autoclavage. La composition du milieu est présentée dans le tableau 4.

Afin d'éviter une précipitation due aux cations divalents et prévenir l'oxydation, la solution ferrique est préparée séparément avec un facteur de concentration de 400, à pH 1 ajusté avec de l'HCl. Cette solution est filtrée dans un flacon préalablement stérilisé et est rajoutée en début de culture dans le réacteur.

Tableau 4 : Milieu salin initial pour 1 L de milieu permettant d'obtenir une concentration en biomasse de 5 g.L⁻¹.

Composé	Quantité (g)
MgSO ₄ ,7H ₂ O	3
KH ₂ PO ₄	4,8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,2
glutamate mono sodique	1,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6
CaCl ₂ ,2H ₂ O	0,048
MnSO ₄ ,H ₂ O	0,0016
CoCl ₂ ,6H ₂ O	0,034
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	0,037
Na ₂ MoO ₄ ,2H ₂ O	0,0064
H ₃ BO ₃	0,0004
CuSO ₄ ,5H ₂ O	0,0067
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ,6H ₂ O	0,0694

I.2.2.b. Milieu de fed-batch

La mise en œuvre est de type discontinu alimenté en condition de limitation par le carbone à laquelle est associée une alimentation en sels avec un débit 10 fois plus faible que celui imposé pour le substrat (Tableau 5). Ce rapport de débit permet de satisfaire deux contraintes : éviter toute précipitation de la solution saline d'alimentation et limiter l'effet de dilution du milieu de culture. L'alimentation en sels est mise en route dès que la concentration cellulaire atteint la valeur de 5 g.L⁻¹.

Tableau 5 : Composition d'un litre de milieu salin d'alimentation.

Composé	Quantité (g)
MgSO ₄ ,7H ₂ O	36,1
CaCl ₂ ,2H ₂ O	0,092
CoCl ₂ ,6H ₂ O	0,3
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	1,143
Na ₂ MoO ₄ ,2H ₂ O	0,041
H ₃ BO ₃	0,035
CuSO ₄ ,5H ₂ O	0,5
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,073
FeSO ₄ , 7H ₂ O	3
NaCl	10
KCl	56
H ₂ SO ₄	212
H ₃ PO ₄	91

I.2.2.c. Solution de vitamines

Les vitamines sont préparées en mélange en solution 1000 fois concentrée (Tableau 6) et sont ajoutées stérilement à la seringue tous les 20 g.L⁻¹ de biomasse formée.

Tableau 6 : Composition d'un litre de solution de vitamines concentrée 1000 X.

Composé	Quantité (g)
d-biotine	0,05
Acide panthoténique	1
Acide nicotinique	1
Myo-inositol	25
Thiamine hydrochloride	1
Pyridoxol hydrochloride	1
Acide p-aminobenzoïque	0,2

La biotine est dissoute dans 10 mL de NaOH 0,1 M ensuite, 750 mL d'eau sont ajoutés, le pH de la solution est ajusté à 6,5 avec de l'HCl 1 M. Les autres composés sont dissous un à un en maintenant le pH à 6,5 avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique ; le volume final est ajusté à 1 L. La solution est stérilisée par filtration dans des bouteilles stériles, puis est conservée à 4°C.

II. Conditions de culture

II.1. Inoculum

Les inocula ont été préparés à partir d'une même culture récoltée en phase exponentielle de croissance additionnée de glycérol et réparties en fractions de 1 mL. Les inocula ainsi obtenus sont stockés à -80°C. Cette procédure permet de toujours initier les précultures avec un inoculum homogène.

II.2. Précultures

Les précultures sont réalisées en trois étapes à partir des cryotubes conservés à -80°C.

- Un cryotube est utilisé pour ensemer un tube contenant 5 mL de milieu riche.
- Le contenu du tube à essai est ensuite transféré dans une fiole d'Erlenmeyer bafflée de 250 mL contenant 50 mL de milieu minimum et du glucose à une concentration finale de 15 g.L⁻¹.

- Le contenu des fioles d'Erlenmeyer est ensuite transféré dans une fiole d'Erlenmeyer bafflée de 2 L contenant 450 mL de milieu minimum et du glucose à une concentration finale de 15 g.L^{-1} .

A chaque étape, les cultures sont incubées à 30°C sous une agitation orbitale de 120 RPM durant 12 heures. Ces opérations sont réalisées en double afin d'avoir un volume d'inoculum final de 1 L.

II.3. Cultures en fermenteur de 20 L

Les cultures sont réalisées dans un fermenteur B. BRAUN (Modèle Biostat E, BRAUN DIESSEL BIOTECH, Melsungen, Allemagne) équipé de modules de mesure et régulation du pH (sonde FERMPROBE BROADLEY-JAMES Co., Santa Ana, USA), de l'oxygène dissous (sonde INGOLD, Urdorf, Suisse) et de la pression (Figure 14).

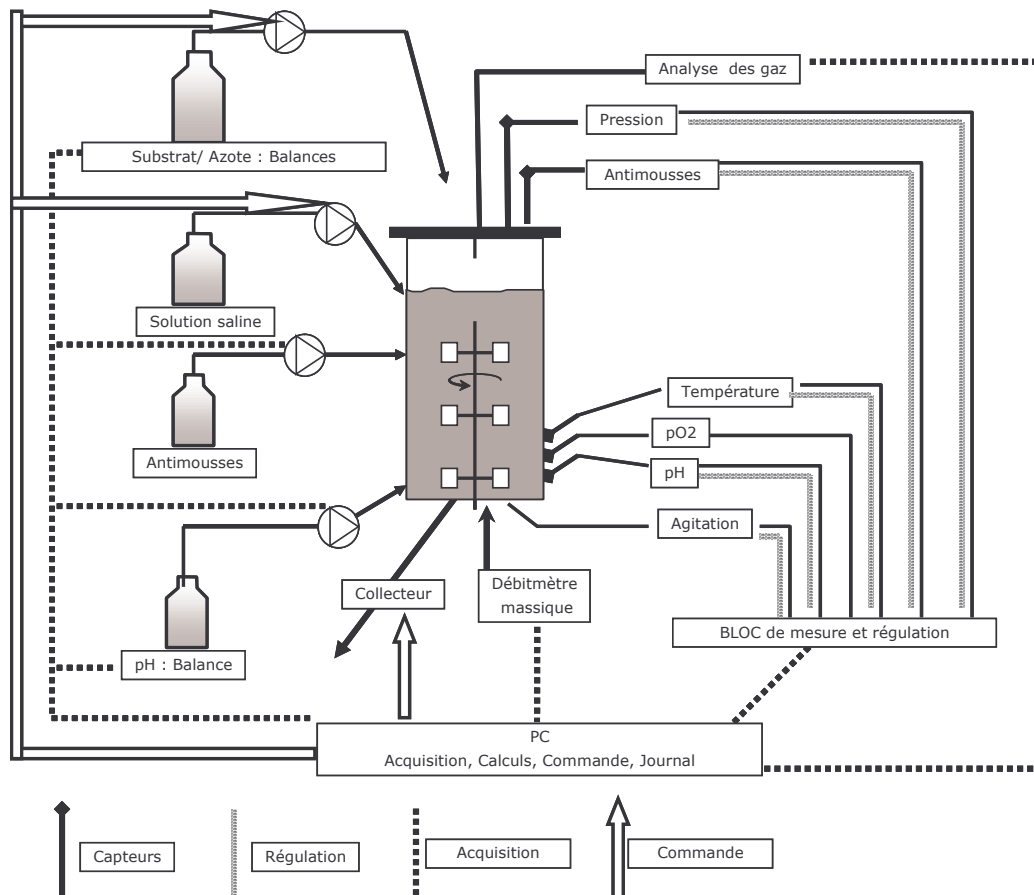


Figure 14 : Schéma du réacteur instrumenté en culture de type fed-batch.

Le fermenteur est connecté à un micro-ordinateur de type PC. Le module d'entrée permet l'acquisition en ligne des données des capteurs (vitesse d'agitation, température,

pH, oxygène dissous, pression), du temps de fonctionnement des pompes de liquides régulateurs de pH, d'antimousse ainsi que la commande des pompes d'alimentation en substrat, tandis qu'une liaison reliant la balance (modèle I 12000 S, SARTORIUS, Goettingen, Allemagne) à l'ordinateur permet la lecture en ligne de la masse du réservoir contenant la solution de substrat d'alimentation. Ainsi, la quantité de sucre envoyée dans le fermenteur est estimée en temps réel.

Le réacteur est stérilisé « in situ », avant son utilisation, à 120°C pendant 30 minutes. Le milieu initial et le milieu d'alimentation contenant les sels et les oligo-éléments sont stérilisés séparément par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, puis sont transvasés stérilement dans le fermenteur. Les vitamines sont ajoutées stérilement à la seringue. La solution de glucose est préparée séparément à une concentration voisine de 700 g.L⁻¹ et stérilisée en autoclave 20 minutes à 120°C.

Le pH est régulé par addition d'une solution d'ammoniaque à 28 % et la température est maintenue constante à 30°C par circulation d'eau dans la double enveloppe. Le Structol J673 est utilisé comme agent antimousse.

La composition des gaz de sortie de fermenteur est analysée soit par une armoire à gaz type analyseur O₂-CO₂ (Modèle EGAS 8, BRAUN, Allemagne), soit par un spectromètre de masse (PRIMA 600S, VG GAZ).

II.3.1. Commande des débits

Plusieurs modes de commande sont réalisables lors de nos cultures de type fed-batch (Figure 15), le mode le plus utilisé lors de cette étude étant le mode exponentiel.

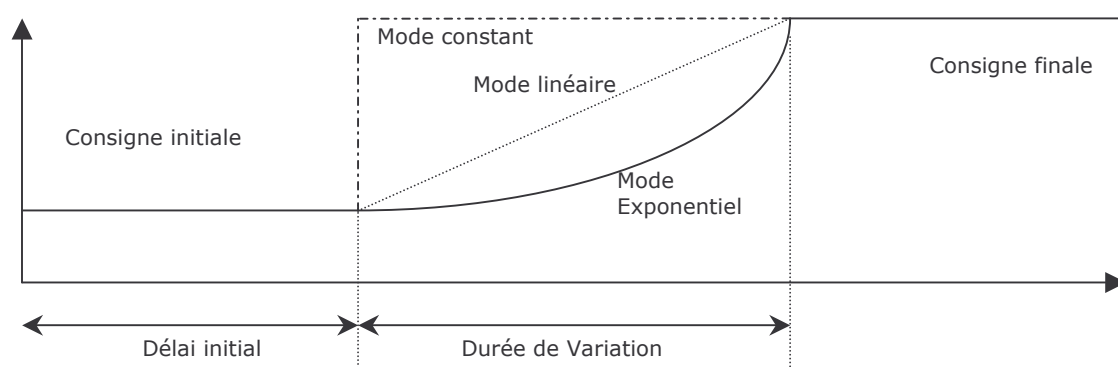


Figure 15 : Présentation des modes de commande effectués sur l'apport de substrat dans le réacteur lors d'une culture de type fed-batch.

II.3.1.a. Présentation des calculs des consignes d'alimentation pour un débit exponentiel

Si l'on considère la source carbonée limitante pour la croissance, le taux de croissance (μ) sera constant si la concentration résiduelle en substrat est constante selon le formalisme de Monod. La vitesse spécifique de croissance peut s'écrire comme $q_s = -(\frac{\mu}{Y_{SX}} + m)$ avec Y_{SX} : rendement théorique limite et m : coefficient de maintenance.

Le bilan matière sur le réacteur s'écrit selon l'équation suivante (**équation 7**):

$$\frac{d(S.V)}{dt} = \frac{dS}{dt} V + \frac{dV}{dt} S = -(\frac{\mu}{Y_{SX}} + m).X.V + Q_{(t)}.S_A \text{ avec } S_A \text{ concentration équivalente en}$$

substrat dans l'alimentation tenant compte des autres volumes apportés directement proportionnels au volume d'alimentation, comme dans notre cas, l'alimentation en sels.

En première approximation, l'évolution du volume réactionnel peut être attribuée au seul débit d'alimentation en substrat. En réalité, il existe un effet de dilution par l'apport des liquides correcteurs de pH et de concentration due à l'évaporation liée au débit de gaz de ventilation.

Ainsi pour le volume l'équation de variation peut être : $\frac{d(V)}{dt} = Q_{(t)}$ et l'équation

précédente peut s'écrire $\frac{dS}{dt} = -(\frac{\mu}{Y_{SX}} + m).X + \frac{Q_{(t)}}{V}.(S_A - S)$ et la variation de la concentration en substrat est supposée nulle.

L'équation bilan pour la biomasse s'écrit : $\frac{d(X.V)}{dt} = \mu.X.V$ et a pour solution si le taux de croissance est constant : $X.V_{(t)} = X_0.V_0.\exp^{(\mu.t)}$.

$$\text{Ainsi, } \frac{dS}{dt} = -(\frac{\mu}{Y_{SX}} + m).X + \frac{Q_{(t)}}{V}.(S_A - S) = 0 \text{ soit } Q_{(t)} = (\frac{\mu}{Y_{SX}} + m).X_0.V_0.\exp^{(\mu.t)} \frac{1}{(S_A - S)}.$$

Ainsi un débit exponentiel va permettre d'obtenir une croissance exponentielle.

Si μ est constant, le rendement en biomasse s'exprime par la relation

$$R_{SX} = \frac{\mu}{\frac{\mu}{Y_{SX}} + m} \text{ et peut être considéré comme constant, et } S \text{ est négligé devant } S_A ,$$

l'équation du débit peut être approchée par : $Q_{(t)} = \frac{\mu}{R_{SX}}.X_0.V_0.\exp^{(\mu.t)} \frac{1}{S_A}$ **Equation 8.**

Au temps $t=0$, $Q_{(0)} = \frac{\mu}{R_{SX}} \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot \frac{1}{S_A}$ dans laquelle $\frac{X_0 \cdot V_0}{R_{SX}}$ représente la quantité totale de substrat consommé (M_0) directement mesurable en ligne. L'équation de débit permettant d'obtenir une croissance exponentielle à un taux de croissance imposé par la limitation en substrat devient $Q_{(t)} = Q_{(0)} \exp^{(\mu \cdot t)} = \frac{M_0 \cdot \mu}{S_A} \cdot \exp^{(\mu \cdot t)}$. Le débit de la solution saline est fixé au dixième du débit d'alimentation en substrat. Il est à noter que l'équation de variation de la concentration en biomasse en fonction du temps s'écrit

$$X_{(t)} = \frac{X_0 \cdot \exp^{(\mu \cdot t)}}{1 + X_0 (\exp^{(\mu \cdot t)} - 1) \cdot \left(\frac{1}{Y_{SX}} + \frac{m}{\mu} \right) \left(\frac{1}{S_A - S} \right)} \quad \text{(Equation 9).}$$

II.3.2. Principe de la régulation PID de l'apport de glucose

Un contrôle PID de l'apport du substrat basé sur la mesure du coefficient respiratoire a été mis en place. Ce contrôle PID est réalisé de sorte à rester toujours en métabolisme purement oxydatif ($QR = 1$) ; sa programmation est présentée sur la figure 16.

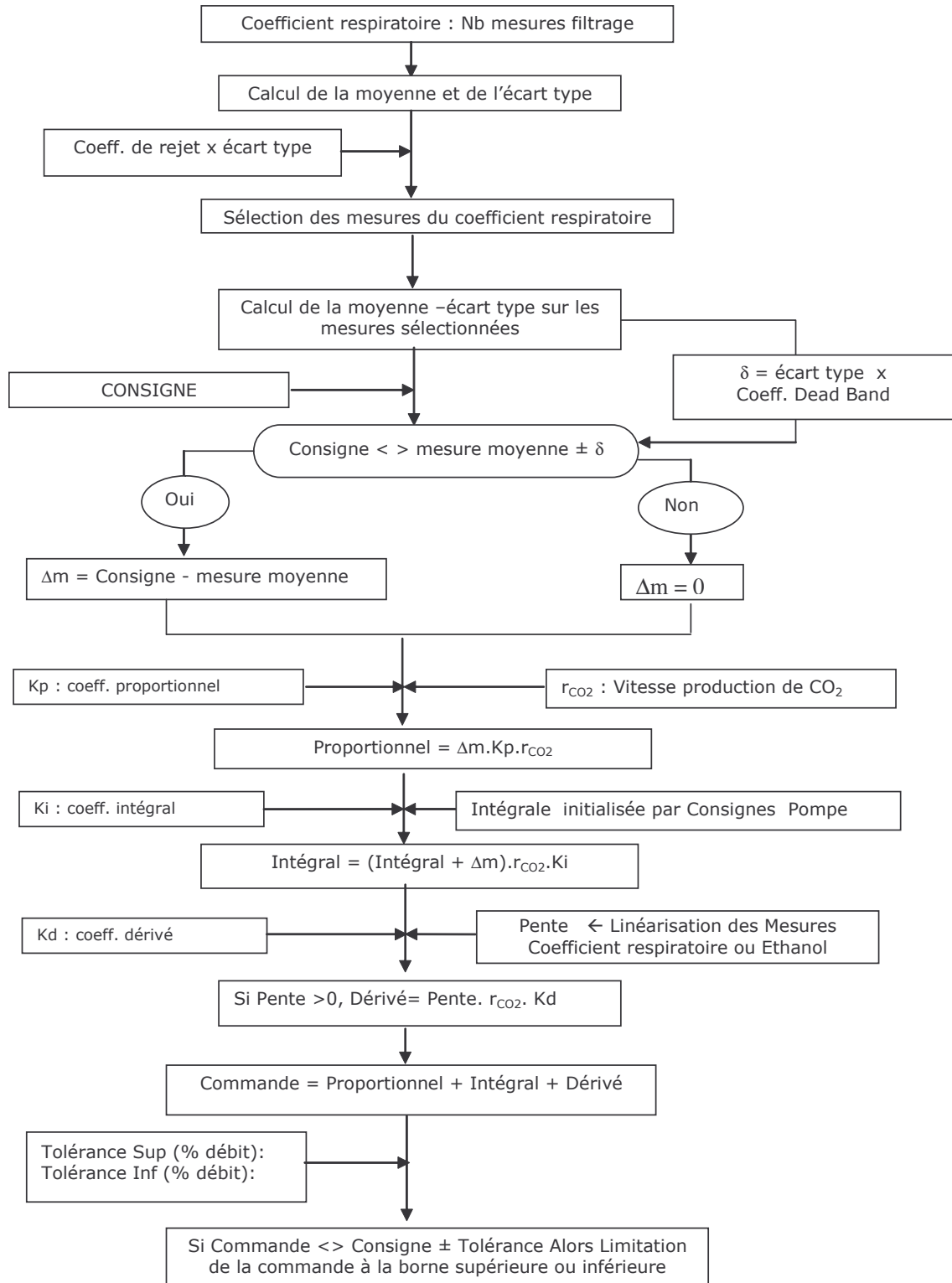


Figure 16 : Principe de la commande PID du débit de substrat, basé sur la mesure du coefficient respiratoire ou de l'éthanol dans les gaz de sortie du réacteur.

La consigne sera prise légèrement supérieure à la valeur moyenne mesurée lors d'une phase de croissance dont on sait qu'elle est uniquement oxydative. La variable prise pour

l'action dérivée est soit le coefficient respiratoire, soit la mesure de l'éthanol lorsque celle-ci est disponible en ligne.

II.3.3. Prise d'échantillons

Outre l'échantillonnage manuel effectué à intervalles réguliers afin de suivre l'évolution de la concentration en biomasse, est mis en place un module de microfiltration tangentielle (Applicon, membrane Sartorius, 0,45 μm , figure 17) alimenté par une pompe péristaltique permettant d'obtenir un filtrat à intervalles réguliers jusqu'à une fréquence élevée (30 secondes).

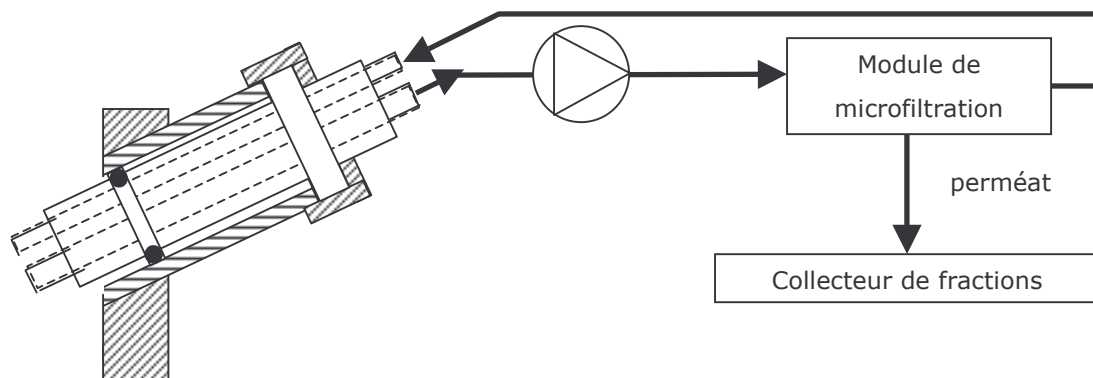


Figure 17 : Représentation schématique du module de filtration tangentielle.

III. Techniques analytiques

III.1. Mesure de la concentration en biomasse

III.1.1. Mesure turbidimétrique

La densité cellulaire est estimée par mesure de la diffraction à 600 nm (spectrophotomètre HITACHI Modèle U-1100) dans une cuve en verre de 0,2 cm de trajet optique contre un blanc contenant de l'eau distillée. Des dilutions sont nécessaires pour rester dans la gamme de validité d'une corrélation linéaire entre la concentration massique en biomasse et la densité optique, soit 0,1 – 0,6 UDO.

III.1.2. Mesure gravimétrique

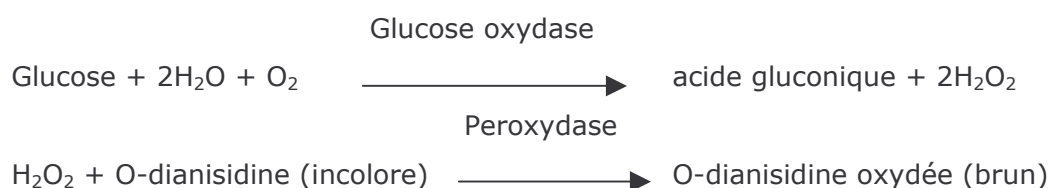
Après filtration d'un volume connu d'échantillon (de 10 à 25 mL) sur une membrane de porosité 0,45 μm , préalablement séchée et pesée, la membrane est lavée avec de l'eau distillée, séchée à l'étuve sous vide (200 mm de Hg à 60°C) pendant 24 heures et enfin pesée. La concentration en masse sèche est déterminée par différence des deux pesées et ramenée au volume filtré.

III.2. Analyse des surnageants de culture

Les prélèvements sont effectués à l'aide d'une seringue à travers un septum ou par filtration tangentielle. Pour le premier type de prélèvements, le milieu de culture est réparti dans des tubes Eppendorf et centrifugé à 10000*g pendant 5 minutes (Centrifugeuse Eppendorf, 5415D), le surnageant est ensuite conservé à + 4°C pour les analyses ultérieures.

III.2.1. Glucose par un kit enzymatique (Référence Sigma diagnostic glucose 510 A)

Le principe de ce dosage repose sur deux réactions enzymatiques successives comme décrit ci-dessous :



20 µL d'échantillon ainsi que 20 µL de chaque point de la gamme étalon sont disposés en triple sur une microplaque 96 puits. 200 µL de réactif contenant les enzymes et la O-dianisidine sont rajoutés dans chaque puits. La plaque est mise à incuber à 37°C pendant 30 minutes. La densité optique de chaque puits est mesurée à 490 nm contre le blanc composé de 20 µL d'eau distillée et 200 µL de réactif. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose. La gamme étalon est comprise entre 0 et 0,2 g.L⁻¹ de glucose.

III.2.2. Co-métabolites

HPLC

Le surnageant de culture est filtré sur une membrane de 0,2 µm et analysé par chromatographie liquide haute performance (WATERS, Alliance 2690) à l'aide d'une colonne H⁺ échangeuse d'ions (300 mm x 7,8 mm). Les échantillons sont élués par une solution de H₂SO₄ à 5 mM, dont le débit est fixé à 0,5 mL.min⁻¹, l'analyse s'opère à 50°C et dure 32 minutes. La détection se fait par un réfractomètre (WATERS, 2414). L'intégration des pics est réalisée par un micro-ordinateur de type PC, par le logiciel d'acquisition et de traitement des données (Millénium 32, WATERS). Pour les différents co-métabolites détectés et identifiés, les concentrations sont déduites à partir de courbes étalons préalablement établies.

CPG

Les produits volatils de fermentation (éthanol et acétate) sont dosés par chromatographie en phase gazeuse sur un chromatographe (Hewlett-Packard Co, Palo Alto, Ca. USA) équipé d'une colonne semi-capillaire (30 m x 0,32 mm, Supel-Q-Plot, SUPELCO, Pennsylvanie, USA). L'appareil est muni d'un détecteur à ionisation de flamme et couplé à un intégrateur HP 3396-A (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, Ca. USA). L'azote est utilisé comme gaz vecteur à une pression de 1,4 bars en tête de colonne. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont égales à 250°C. La température du four est programmée de la façon suivante :



Les échantillons sont dosés en présence d'un étalon interne (2-méthyl propan-1-ol à 20 g.L⁻¹ dans de l'acide sulfurique à 500 mM) ajouté au surnageant de culture dans la proportion de 1 volume d'étalon interne pour 4 volumes de surnageant. La calibration est effectuée à l'aide de solutions étalons de concentrations connues.

III.2.3. Les acides faibles ajoutésL'acide propionique

Cet acide est dosé par CPG comme précédemment décrit pour les produits volatils de fermentation.

L'acide sorbique

Le surnageant de culture est récupéré, filtré sur une membrane de 0,2 µm et analysé par chromatographie liquide haute performance (WATERS, Alliance 2690) à l'aide d'une colonne Nucléosil C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). Les échantillons sont élués par un mélange d'une solution d'acétate de sodium (3,7 mM), pH 4,2 et d'acétonitrile (63/37 v/v) dont le débit est fixé à 1 mL.min⁻¹. L'analyse s'effectue à 30°C pendant 9 minutes. La détection se fait par spectrophotométrie UV (WATERS, 996) à 259 nm. L'intégration des pics est effectuée par un micro-ordinateur de type PC, par un logiciel d'acquisition et de traitement des données (Millénium 32, Waters). La gamme de validité de la mesure se situe entre 1 mg.L⁻¹ et 1 g.L⁻¹.

III.2.4. Détermination de l'azote ammoniacal résiduel

Le dosage des ions ammonium est réalisé à l'aide d'une électrode à ammonium ORION Model No. 95-12 (Orion Research Inc, Boston, USA) connecté à un voltmètre (ORION pH/ISE Meter Model 710A). 5 mL d'échantillon sont placés sous agitation en

présence de 200 μL d'un tampon ISA (Ionic Strength Adjustor : solution de NaOH 5 M/0,05 M disodium EDTA/méthanol 10 % avec la thymolphthaleïne comme indicateur de pH) permettant d'alcaliniser l'échantillon. Le tampon ainsi additionné permet de déplacer les ions ammonium contenus dans l'échantillon sous forme gazeuse (ammoniac). La tension mesurée est proportionnelle à la concentration en ions ammonium ; la gamme étalon est réalisée avec une solution de NH_3Cl et est comprise entre 10^{-5} et 10^{-1} M.

III.3. Calculs de la concentration intracellulaire en cations

Les cations (Ca^+ , Na^+ , Mg^+ et K^+) sont dosés sur 20 mL de surnageant de culture, préalablement filtrés sur des membranes de 0,2 μm , par spectrométrie à torche à plasma par la société Lanex Environnements, Muret, France.

Le contenu intracellulaire en cations est ensuite calculé selon un bilan matière à partir des quantités introduites dans le réacteur (initialement et par l'alimentation en sels) et des concentrations résiduelles dosées, tout en connaissant le volume cytosolique des levures obtenu par thermogravimétrie (cf. § III.8).

III.4. Dosage des sucres de réserves

La méthode de dosage du tréhalose et du glycogène intracellulaires a été développée sur la base du protocole établi au laboratoire par Parrou et François (1997).

Les cellules sont prélevées, centrifugées pendant 3 minutes à 4°C à 10000*g (Centrifugeuse Eppendorf, 5415D). Elles sont ensuite lavées dans de l'eau à 4°C et centrifugées à nouveau à 10000*g (les culots peuvent être conservés à -20°C pendant plusieurs mois).

Le culot cellulaire est re-suspendu dans 250 μL de Na_2CO_3 à 0,2 M et incubé trois heures à 95°C. La suspension est agitée régulièrement. Cette étape permet de perméabiliser les membranes cellulaires.

Ensuite, 150 μL d'acide acétique à 1 M et 600 μL d'acétate de sodium à 0,2 M sont ajoutés. A ce moment là, 500 μL de suspension vont servir pour doser le glycogène et 2 x 250 μL pour doser le tréhalose.

Pour le dosage du glycogène, 20 μL α -amyloglucosidase (ROCHE DIAGNOSTICS, 8 U.mL^{-1}) sont ajoutés à 500 μL d'extrait et incubés 24 heures à 56°C. Pour le dosage du tréhalose, 5 μL de tréhalase (SIGMA, 2,04 U.mL^{-1}) sont ajoutés à 250 μL d'extrait et incubés 48 heures à 37°C.

Après incubation, les extraits sont centrifugés (2 min à 10000*g) et le glucose libéré est dosé dans le surnageant par la méthode de la glucose oxydase (cf. dosage du glucose, § III.2.1.).

III.5. Dosage des métabolites intracellulaires

Le métabolisme cellulaire est arrêté en transférant instantanément le milieu de culture en sortie de fermenteur dans une solution de méthanol-tampon 10 mM d'Hépès (60/40 v/v) conservée à -40°C (Gonzalez et coll., 1997).

Les étapes suivant l'arrêt du métabolisme sont une extraction à l'éthanol chaud puis une concentration par évaporation (Groussac et coll., 2000).

Les métabolites sont ensuite quantifiés par chromatographie Dionex (High Performance Ionic Chromatography) ; pour chaque type de métabolites une méthode différente est utilisée.

Les nucléotides sont séparés sur une colonne IonPac AS11 avec un gradient de NaOH de 0 à 40 mM contenant 20 % de méthanol. La détection se fait par conductimétrie couplée à une quantification en UV à 260 nm pour vérifier le spectre spécifique (PDA100 de DIONEX, suppresseur d'anions AMMS11, 4 mm de DIONEX).

Les acides organiques et les anions inorganiques sont séparés sur une colonne IonPac AS11 avec un gradient de NaOH de 0 à 60 mM contenant 10 % de méthanol. La quantification se fait par conductimétrie et par spectrophotométrie UV à 220 nm pour l'identification d'une possible coélution (suppresseur d'anions AMMS11 4 mm de DIONEX).

Les sucres phosphorylés appartenant à la glycolyse et à la voie des pentoses phosphates sont séparés sur une colonne CarboPac PA1 avec un gradient NaOH/Na-Acétate. La détection se fait par ampérométrie pulsée couplée à une détection UV, pour l'identification d'une possible coélution.

Pour le suivi de l'évolution de chaque métabolite intracellulaire, la concentration exprimée est en $\text{mg.g de cellules}^{-1}$.

III.6. Détermination de la pression osmotique

La pression osmotique des milieux est déterminée à l'aide d'un micro-osmomètre ROEBLING modèle 12/12 DR (HERMANN ROEBLING, Berlin, Allemagne).

Le principe de la mesure est la détermination du point de congélation par rapport à de l'eau distillée donnant une mesure directe de la concentration osmolaire.

L'appareil est calibré avec de l'eau distillée ($0 \text{ mOsmol.kg H}_2\text{O}^{-1}$) et un standard à $300 \text{ mOsmol.kg H}_2\text{O}^{-1}$, les résultats sont donnés directement en $\text{mOsmol.kg H}_2\text{O}^{-1}$. Les échantillons à forte osmolarité (supérieure à $300 \text{ mOsmol.kg H}_2\text{O}^{-1}$) sont dilués dans de l'eau distillée.

III.7. Mesure de la capacité fermentaire de la levure en présence ou non d'acide

Ce test est réalisé en milieu à forte pression osmotique (dont la composition et la réalisation sont les propriétés de la société) en présence ou non de l'acide propionique. Ce milieu est appelé milieu M1.

Dans un tube sont introduits un volume de milieu et un volume de suspension cellulaire. Ce test est réalisé sur deux heures, à 30°C avec un tube témoin sans acide et un tube contenant l'acide propionique ou l'acide sorbique.

A la fin du test, les milieux de culture sont centrifugés (5 min à 10000*g) et le surnageant est retiré et conservé à + 4°C. L'éthanol produit est ensuite dosé par CPG. La capacité fermentaire est analysée en comparant la vitesse spécifique de production d'éthanol dans chacun des tubes.

III.8. Mesure du volume intracellulaire par thermogravimétrie

La thermogravimétrie permet d'évaluer la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température. Il s'agit d'une méthode permettant d'estimer les contenus en eau intracellulaire et exocellulaire en interprétant les cinétiques d'élimination de l'eau pendant un processus de séchage de micro-organismes (Figure 18).

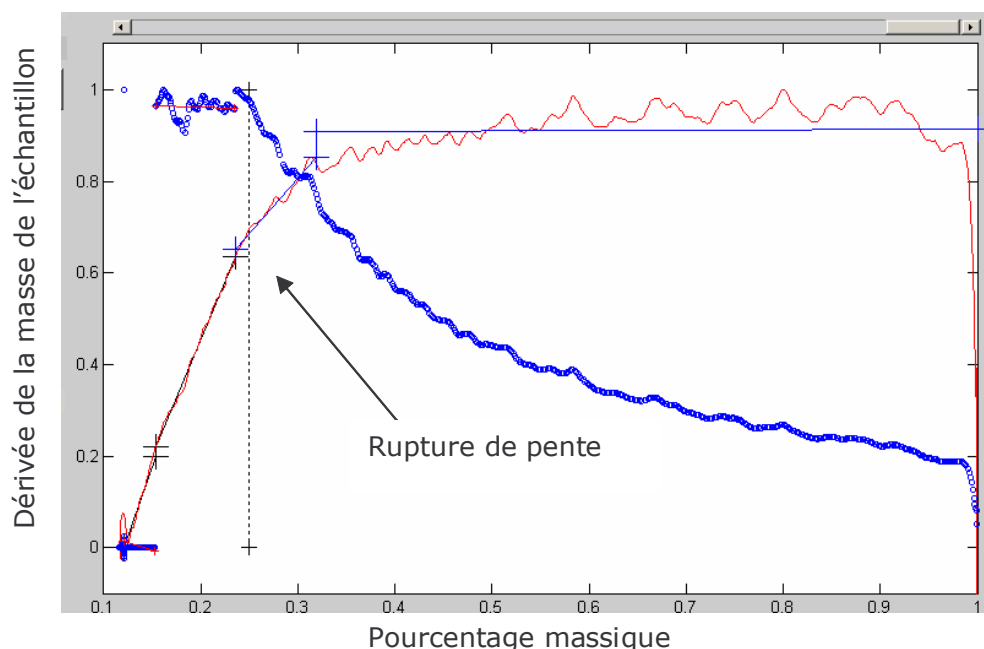


Figure 18 : Cinétique de séchage d'un échantillon de biomasse pour la détermination du volume cytosolique obtenue après traitement sous Matlab. — : dérivée de la masse de l'échantillon en fonction du pourcentage massique (normé par rapport à la masse initiale) et o : intermédiaire de calcul.

Au cours du processus de séchage, l'évaporation de l'eau extracellulaire suit une dynamique d'ordre zéro et est suivie d'une seconde phase de dessiccation correspondant à l'élimination de l'eau intracellulaire selon une dynamique d'ordre 1. Dès le début de l'évaporation de l'eau intracellulaire, une rupture dans la continuité de la courbe d'évolution de la masse en fonction du temps est observée : c'est un point critique. Il peut être déterminé en traçant la dérivée de la masse au cours du temps en fonction de la masse résiduelle. L'élimination de l'eau intracellulaire peut être linéarisée et par conséquent, il est possible de connaître le moment de l'apparition de ce point critique. Par la connaissance de la masse à ce point précis et de la matière sèche finale, nous pouvons en déduire la quantité d'eau intracellulaire relative (Uribelarrea et coll., 1985).

Pour réaliser cette mesure, l'échantillon est placé dans un module de séchage (75°C) d'une thermo-balance (METTLER LJ16), équipée d'une interface avec un ordinateur de type PC pour l'acquisition en ligne des données (temps et masse de l'échantillon). En ligne, la durée de l'expérimentation et la masse de l'échantillon sont acquises toutes les 0,1 minutes.

III.9. Analyse de la respiration cellulaire

III.9.1. Analyse des gaz en sortie de fermenteur

La composition du gaz à la sortie du réacteur est mesurée soit par une armoire à gaz et donc par spectrométrie infrarouge pour le CO₂ et paramagnétisme pour l'oxygène (Modèle EGAS 8, BRAUN, Allemagne), soit par spectrométrie de masse.

Le débit de gaz à l'entrée du réacteur est mesuré grâce à un débitmètre massique (modèle 5850 TR, BROOKS Instrument, Emerson Process Management, USA). Un deuxième débitmètre massique est branché en parallèle à l'analyseur de gaz permettant de diluer avec l'air les gaz de sortie de fermenteur lors de l'analyse avec l'armoire à gaz (Figure 19).

En effet, un mélangeur statique permet la dilution des gaz afin de ramener le pourcentage en dioxyde de carbone à une valeur inférieure à 10 % (gamme de mesure de l'analyseur infrarouge). Ce mélange est ensuite séché et envoyé vers l'analyseur.

courbes sont traitées par lissage des points expérimentaux à l'aide d'une feuille Excel. Les points expérimentaux sont estimés sur une fenêtre glissante par ajustement des polynômes, sur un critère des moindres carrés. Ce lissage permet d'obtenir une continuité de la valeur lissée et de sa dérivée.

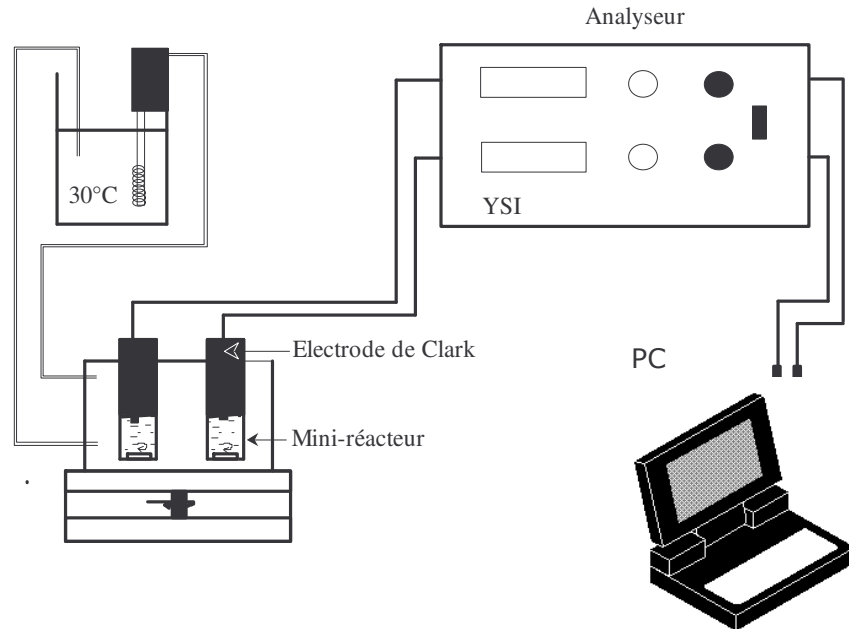


Figure 20 : Schéma de fonctionnement du respiromètre.

III.10. Analyse élémentaire de la biomasse

Les analyses de la composition de la biomasse en carbone (C), oxygène (O), hydrogène (H) et azote (N) sont fournies par le Service Inter-universitaire de microanalyse de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse (ENSC-Toulouse). Les cellules récoltées pour les différentes conditions de fermentation sont centrifugées, séchées (200 mm Mg, 60°C, 24 heures) et conservées à l'abri de l'humidité. Le pourcentage de cendres est déterminé par différence massique après analyse de C, H, O et N.

La composition élémentaire de la biomasse prise pour les différents calculs est la suivante : $\text{CH}_{1,65}\text{O}_{0,54}\text{N}_{0,19}$, correspondant à une masse molaire de $27,51 \text{ g.mol}^{-1}$ et un degré de réduction de 4,01. Cette composition pourra être réajustée selon les résultats obtenus par la réconciliation des données.

III.11. Analyse transcriptomique

L'analyse transcriptomique est réalisée en partenariat avec la plateforme Biopuces de Toulouse (<http://biopuce.insa-toulouse.fr>). Les « puces à ADN » utilisées sont des

lames de verre à revêtement chimique, 5700 gènes de *S. cerevisiae* sont représentés par des oligonucléotides spécifiques (25 mers) déposés en duplicat sur la lame.

L'analyse des profils d'expression des gènes est basée sur la détermination des variations significatives des niveaux d'expression des gènes d'un organisme dans deux conditions physiologiquement différentes. Il s'agit donc d'une mesure différentielle de l'expression des gènes.

III.11.1. Récupération des cellules et broyage cellulaire

Les cellules récoltées pour différentes conditions de culture sont directement plongées dans un mélange méthanol/eau (60/40% v/v) conservé à -40°C. L'échantillon est ensuite filtré rapidement sur membrane de 0,45 µm, la biomasse est récupérée à l'aide d'une spatule et placée dans un tube Eppendorf maintenu dans l'azote liquide. Les culots cellulaires obtenus sont ensuite conservés à -20°C.

Les cellules sont broyées mécaniquement (2600 RPM pendant 2 minutes) par une bille de tungstène de 7 mm de diamètre, dans un broyeur (microdismembrator, BRAUN, Melsungen, Allemagne). Tout le matériel servant au broyage des cellules doit être préalablement refroidi dans l'azote liquide pour maintenir les fragments cellulaires en dessous de leur point de congélation. Les débris cellulaires sont directement versés dans la solution de lyse RLT du kit RNeasy Midi Kit (Qiagen, Allemagne) afin d'extraire les ARN totaux.

III.11.2. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux à partir de fragments cellulaires congelés est exécutée en suivant les recommandations du fournisseur du kit RNeasy Midi Kit (Qiagen, Allemagne). La méthode Qiagen combine les propriétés de fixation sélective des membranes de silice et de multiples étapes de centrifugation.

La qualité et la quantité d'ARN préparés sont estimées à l'aide du kit (RNA 6000 Nano LabChip kit) de chez Agilent Technologies qui utilise un micro-système d'électrophorèse capillaire. Le kit d'analyse est ensuite révélé à l'aide d'un appareil de lecture (Agilent bionalyser 2100) disponible à la plateforme Biopuces (Toulouse).

III.11.3. Rétro-transcription et marquage des ARN totaux

Les cibles sont synthétisées par une rétro-transcription des ARNm en présence d'une amorce oligo(d'T) afin d'obtenir des brins d'ADNc marqués par une molécule fluorescente. Les nucléotides utilisés contiennent un fluorochrome : carbocyanines 3 et 5 (Cy3 et Cy5) qui fluorescent respectivement dans le vert et le rouge. Les ARN totaux sont rétro-transcrits et marqués simultanément à l'aide du kit Labelstar Array (Qiagen). Le protocole appliqué pour chaque condition est le suivant : 20 µg d'ARN totaux sont rétro-transcrits à partir d'un mélange d'amorces hétérogènes constitué de 2 µM

d'amorces d'oligo-d'(T). La réaction est effectuée à 37°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,1 mg.mL⁻¹ de BSA, 500 µM de d'NTP (dATP, dGTP, dTTP), 80 µM de dCTP, 20 µM de CyDye-labelled (Cy3 et Cy5 pour chaque condition), 2 U d'inhibiteur de RNase, et 2,5 µL de Labelstar reverse transcriptase (Qiagen). Après 2 heures, la réaction est stoppée avec 2 µL de NaOH 0,5 M, les ADNc simples brins marqués sont purifiés à l'aide d'une colonne du kit Labelstar Array Cleanup kit et repris dans 20 µL de tampon 10 mM Tris-HCl pH 8,5. Les cibles issues des 2 conditions sont ensuite mélangées et hybridées sur la lame de verre.

III.11.4. Hybridation et lavage

L'hybridation sur lame de verre est réalisée automatiquement dans une chambre Ventana (Discovery, USA). La cible d'ADNc est placée dans un tampon de force ionique élevée afin de réduire les répulsions électrostatiques et faciliter l'appariement des brins complémentaires. Des détergents et des agents bloquants permettant de réduire l'hybridation non spécifique sont ajoutés pour réduire le bruit de fond. La solution cible marquée est déposée au contact des lames, puis est enfermée dans une chambre d'hybridation et mise à incuber à 42°C pendant 10 heures. La lame de verre est ensuite rincée abondamment dans des bains successifs, puis séchée avant la lecture.

III.11.5. Scan et traitements

Les lames hybridées ont été scannées à l'aide d'un scanner Genepix Pro400a (Axon Instruments). Le scanner est muni de deux lasers (excitations à 532 nm et 635 nm) qui permettent l'acquisition simultanée des signaux émis par les fluorochromes Cy3 et Cy5. La mesure des intensités des signaux de fluorescence relatifs à chacun des fluorochromes permet finalement de calculer pour chaque gène le rapport des intensités qui évalue son expression différentielle. Les images acquises ont été analysées et quantifiées par le logiciel GenePix Pro v. 3.0 (Axon Instrument).

Les données brutes générées par le logiciel GenePix Pro v. 3.0 sont incorporées dans la base de données de la plateforme et sont traitées par le logiciel Bioplot. Il s'agit d'un logiciel hébergé par la plateforme Biopuces (Toulouse) permettant de comparer les données transcriptomiques de deux conditions biologiques différentes : une condition où le métabolisme est stabilisé (référence) et une condition de stress (pulse acide). Ainsi, il est possible de sélectionner significativement les gènes ayant subi un changement.

Le traitement de chaque signal comporte les étapes suivantes :

- Correction du bruit de fond : l'intensité médiane de chaque spot est corrigée par la soustraction de la médiane du bruit de fond.
- Log transformation : les intensités corrigées sont transformées par l'application de log₁₀ (...).

- Normalisation : le Log de l'intensité de chaque spot est normalisé par la soustraction de la moyenne des log-intensités.
- Log-Ratio : les log-ratios des log-intensités normalisées sont calculées (log-int-normCy3 - log-int-normCy5).
- Moyenne des duplicats sur la même lame : la moyenne arithmétique des log-ratios entre les spots répliqués est calculée. Ainsi chaque gène a un log-ratio par lame.
- Filtrage par test de Student et ratio : la moyenne des log-ratios et l'erreur calculée pour chaque gène à l'étape précédente sont utilisées pour faire un test de Student et retenir les gènes qui ont une P-value inférieure à 5 % (degré de confiance donné aux résultats).

IV. Traitement des données expérimentales

IV.1. Gaz de fermentation

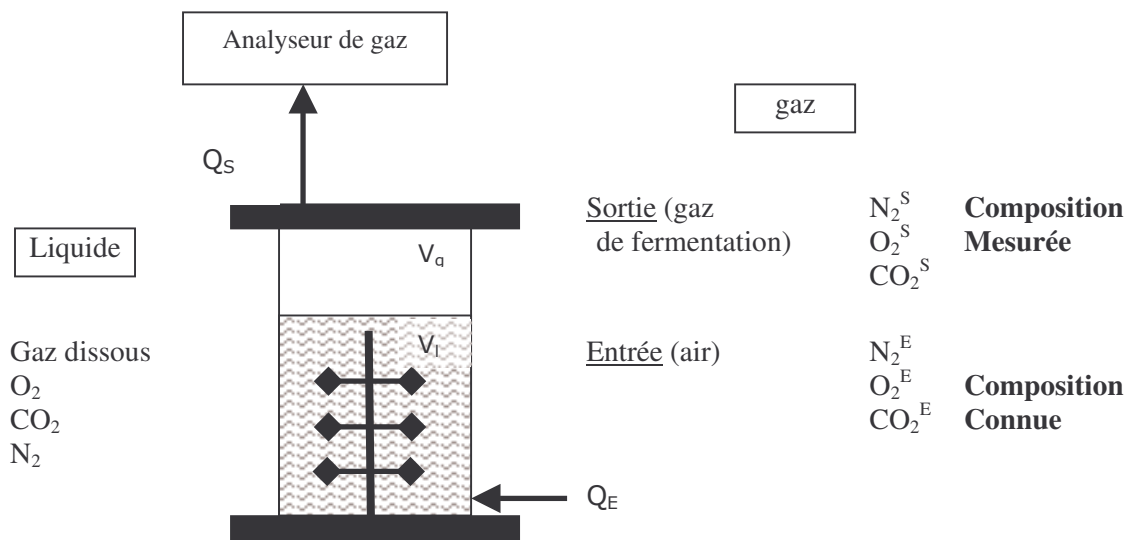


Figure 21 : Paramètres de calcul des bilans gazeux.

IV.1.1.a. Bilan pour un composé X du gaz

L'équation de conservation de la matière pour la phase gazeuse et la phase liquide établie à partir de la figure 21 s'écrit :

Accumulation = [entrée - sortie] + [production - consommation]

$$\frac{d(X_{dissous} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(X_{gaz} \cdot V_g)}{dt} = (Q_E \cdot X_E - Q_S \cdot X_S) + r_X \cdot V_L$$

Equation 10

- V_L et V_g : volumes liquide et de gaz dans le réacteur en L,
- Q_E et Q_S : débits gazeux à l'entrée et à la sortie du réacteur en mol.h^{-1}
- X_E et X_S : les pourcentages de l'espèce X dans les gaz d'entrée et de sortie du réacteur.
- $r_X > 0$ si production et $r_X < 0$ si consommation.

On regroupe sous le terme de flux de transfert global (Φ_X), le terme d'accumulation dans la phase liquide ainsi que le terme de production ou de consommation.

$$\frac{d(X_{gaz} \cdot V_g)}{dt} = (Q_E \cdot X^E - Q_S \cdot X^S) + \Phi_X \quad \text{Equation 11}$$

$$\Phi_X = \frac{d(X_{dissous} \cdot V_L)}{dt} + r_X \cdot V_L \quad \text{Equation 12}$$

IV.1.1.b. Azote

L'azote étant un gaz inerte, il ne subit qu'un phénomène de transport au sein de la phase liquide sans conversion. L'azote étant très peu soluble dans la phase liquide ($\alpha = 0,0134$ à 30°C), le terme $\frac{dN_{2gaz}}{dt}$ peut être négligé. Le flux global de transfert d'azote peut donc lui aussi être négligé. Le bilan sur l'azote permet alors d'estimer le débit d'entrée Q_S d'après la mesure du débit d'entrée Q_E et les compositions en azote N_2^E et N_2^S des gaz d'entrée et sortie.

$$Q_S = \frac{\frac{d(V_g \times N_2^E)}{dt} + Q_E \times N_2^E}{N_2^S} \quad \text{Equation 13}$$

Les flux du transfert du dioxyde de carbone et de l'oxygène peuvent alors être exprimés :

$$\Phi_{CO_2} = \frac{d(V_g \times CO_2^S)}{dt} - Q_E \times CO_2^E + Q_S \times CO_2^S \quad \text{Equation 14}$$

$$\Phi_{O_2} = \frac{d(V_g \times O_2^S)}{dt} - Q_E \times O_2^E + Q_S \times O_2^S \quad \text{Equation 15}$$

Des expressions précédentes, nous obtenons les vitesses nettes de conversion :

$$r_X = \frac{\Phi_X + \frac{d(V_L \cdot X_{dissous})}{dt}}{V_L} \quad \text{Equation 16}$$

avec $\Phi_X > 0$ si production et $\Phi_X < 0$ si consommation.

IV.1.1.c. Oxygène

$$r_{O_2} = \frac{\Phi_{O_2} - \frac{d(O_{2\text{dissous}} \cdot V_l)}{dt}}{V_l} \text{ en mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1} \quad \text{Equation 17}$$

Pour la phase liquide supposée infiniment mélangée, on peut décrire le bilan par l'équation :

$$\frac{dO_2^{dis}}{dt} = r_{O_2}^{liq} + \Phi_{O_2}^{liq} \quad \text{Equation 18}$$

Pour la phase gazeuse (interne au réacteur) supposée homogène, le bilan se décrit par

$$\text{l'équation : } \frac{dO_2^g \cdot V_g}{dt} = r_{O_2}^g \cdot V_g + \Phi_{O_2}^g \cdot V_g \quad \text{Equation 19}$$

La vitesse de conversion étant nulle dans la phase gazeuse, on a :

$$\frac{dO_2^g}{dt} V_g + \frac{dV_g}{dt} O_2^g = r_{O_2}^g \cdot V_g + \Phi_{O_2}^g \cdot V_g = \Phi_{O_2}^g \cdot V_g \quad \text{Equation 20}$$

$$\text{soit : } \frac{dO_2^g}{dt} V_g + \frac{dV_g}{dt} O_2^g = \Phi_{O_2}^{g-l} \cdot V_g + Q_e O_2^E - Q_s O_2^S \quad \text{Equation 21}$$

avec

$\Phi_{O_2}^{g-l}$: densité volumique de flux de transfert de la phase gazeuse vers la phase liquide,

O_2^g : pression partielle en oxygène dans le volume gazeux,

$O_2^E, O_2^S = O_2^g$: pressions partielles en oxygène pour les débits entrant et sortant.

En égalant les flux de transfert gaz-liquide, nous obtenons :

$$V_g \cdot \Phi_{O_2}^{g-l} = -V_l \cdot \Phi_{O_2}^l \quad \text{Equation 22}$$

On obtient d'après les équations 18 et 21 :

$$Q_e O_2^E - Q_s O_2^S - \frac{dO_2^g}{dt} V_g - \frac{dV_g}{dt} O_2^g = \frac{dO_2^{dis}}{dt} V_L - r_{O_2} \cdot V_L \quad \text{Equation 23}$$

Si le terme $\frac{dO_2^{dis}}{dt}$ est négligé devant le terme flux, la dynamique de variation de l'oxygène dissous étant liée au taux de croissance nettement inférieur au coefficient de transfert d'oxygène ; l'équation revient à :

$$r_{O_2} = \frac{Q_E O_2^E - Q_s O_2^s}{V_L} - \frac{dO_2^g}{dt} \cdot \frac{V_g}{V_L} - \frac{dV_g}{dt} \cdot \frac{O_2^g}{V_L} \approx k_L a (O_2^{sat} - O_2^{dis}) \quad \text{Equation 24}$$

avec k_L coefficient de transfert de masse dans la phase liquide ($m \cdot h^{-1}$), a l'aire spécifique d'échange entre la phase gaz et la phase liquide (m^{-1}).

L'oxygène est présent sous sa forme dissoute dans le milieu liquide et est mesuré sous la forme d'une pression partielle en oxygène dissous (p_{O_2}), cette mesure en pourcentage de la saturation permet d'obtenir la relation suivante :

$$r_{O_2} = k_L a \left(\frac{C^*}{p_{O_2}^*} \right) \times (p_{O_2}^* - p_{O_2}^{mes}) \quad \text{Equation 25}$$

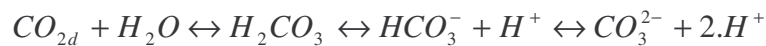
Où, C^* correspond à la concentration en oxygène dissous à la saturation, $p_{O_2}^*$ au pourcentage d'oxygène obtenu à la saturation à la pression atmosphérique et $p_{O_2}^{mes}$ à la valeur mesurée dans le milieu par la sonde à oxygène.

IV.1.1.d. Gaz carbonique

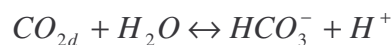
L'équation 10 donne l'expression suivante pour la vitesse de production de CO_2 :

$$r_{CO_2} = \frac{\Phi_{CO_2} - \frac{d(CO_{2s}^{dissou} \cdot V_L)}{dt}}{V_L} \quad \text{Equation 26}$$

Le gaz carbonique présent dans la phase liquide peut se dissocier sous différentes formes :



Comme l'acide carbonique se dissocie de façon pratiquement instantanée, les composés sont minoritaires H_2CO_3 et CO_3^{2-} et peuvent être négligés.



Le CO_2 présent dans le milieu de culture se trouve donc sous deux formes principales : la forme dissoute (CO_{2d}) et la forme dissociée (HCO_3^-). L'accumulation de ces ions bicarbonates peut alors sous estimer le bilan sur le CO_2 produit.

La constante d'équilibre de cette dissociation est :

$$\kappa = \frac{HCO_3^- \times H^+}{CO_{2d}} = 4,71.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$$

Equation 27

Selon la loi de Henry, la concentration en CO₂ dissous est proportionnelle à la pression partielle en CO₂ (p_{CO2s}) au-dessus du liquide dans le gaz effluent : CO_{2d} = p_{CO2s}·H_{CO2} où H_{CO2} est la constante de Henry pour le CO₂. La quantité totale de CO₂ dans le milieu est donc donnée par l'équation suivante :

$$CO_{2m} = CO_{2d} + HCO_3^- = CO_{2d} + \frac{\kappa \cdot CO_{2d}}{H^+} = P_{CO_2} \cdot H_{CO_2} \cdot (1 + \frac{\kappa}{10^{-pH}})$$

Equation 28

Si à pH 7 le CO₂ produit peut représenter 5 % du CO₂ dissous, l'équilibre de dissociation de l'acide carbonique (forme soluble du CO₂) se déplace vers l'acide quand le pH diminue. Ainsi, HCO₃⁻ est négligeable dans nos cultures à pH 4 ou 5 et représente moins de 0,1 % du CO₂ dissous.

IV.2. Traitement des variables

- Afin de pouvoir exploiter les mesures, exprimées en concentration, nous avons tenu compte des variations du volume réactionnel dues aux différents apports et prélèvements, en travaillant sur les grandeurs massiques ou molaires. Le traitement utilisé pour s'affranchir du volume variable du à la conduite de la culture est le suivant :

Nous tenons compte des volumes :

- Volume initial, V₀
- Volume de sels ajouté, V_{sels}
- Volume de liquide correcteur de pH, V_{pH}
- Volume prélevé, V_{prél}
- Volume solution d'alimentation substrat, V_{alim}

Le volume du réacteur se définit de la façon suivante :

$$V_{\text{ferm}} = V_0 + V_{\text{pH}} + V_{\text{sels}} + V_{\text{H2O}} + V_{\text{X,P}} - V_{\text{prél}}$$

Equation 29

V_{H2O} et V_{X,P} proviennent du volume du à l'apport de substrat dans le réacteur et sont calculés comme suit : V_{H2O} = V_{alim} · (ρ_{alim} - S_{alim}) et V_{X,P} = α · (V_{alim} - V_{H2O}) · (1 - Y_{S,CO2}) avec ρ_{alim} : masse volumique de la solution de glucose (kg.L⁻¹), S_{alim} : concentration de la solution du bidon d'alimentation (kg.L⁻¹), Y_{S,CO2} : rendement de transformation du substrat en CO₂ (g.g⁻¹) et α : coefficient correcteur utilisé pour ajuster le volume final du fermenteur calculé au volume final mesuré.

Sur un intervalle de temps dt, la variation de volume hors prélèvement s'écrit : dV = dV_{sels} + dV_{equi} + dV_{pH}. Le facteur de dilution est calculé par l'équation :

$F_d = 1 + \frac{dV}{V_{t-1}}$. Le volume théorique s'écrit alors : $V_{théo} = V_{théo\ t-1} \cdot F_d$ avec $V_{théo\ t=0} = V_0$

Ainsi, pour les différentes variables, les quantités sont obtenues par les calculs suivants :

- Pour une variable fermée (E) :

$$E(g) = E(g.L^{-1}) \cdot V_{théo} \quad \text{Equation 30}$$

- Pour les gaz qui proviennent d'une mesure de vitesse :

$$r'_{gaz} (mole.h^{-1}) = r_{gaz}^{mesure} \frac{V_{théo}}{V_{mesuré}} (mole.h^{-1}) \quad \text{Equation 31}$$

- Pour les substrats, les quantités consommées sont calculées :

$$s'(g) = \int_{t=0}^t \Phi_s \cdot \frac{V_{(t) théo}}{V_{(t) mesuré}} - s^{mesuré} \cdot V_{(t) théo} \quad \text{Equation 32}$$

- Les courbes sont traitées par lissage des points expérimentaux à l'aide d'un algorithme hébergé par Excel développé au laboratoire (Lisexcel). Les points expérimentaux sont estimés sur une fenêtre glissante par ajustement des polynômes, sur un critère des moindres carrés. Ce lissage permet d'obtenir une continuité de la valeur lissée et de sa dérivée première.

- Un logiciel de réconciliation des données (LIREC) développé au laboratoire permet de détecter d'éventuels déficits sur les bilans élémentaires, et lorsque le degré de redondance sur les mesures disponibles est suffisant, il permet d'estimer les valeurs les plus probables des vitesses réactionnelles et par leur intégration dans le temps d'obtenir l'évolution des variables d'état vérifiant la conservation de la matière.

IV.2.1. Calculs des vitesses spécifiques, des rendements et du coefficient respiratoire

En considérant une variable d'état, C_i .

- r_{Ci} : vitesse de réaction pour la variable C_i

- q_{Ci} : vitesse spécifique de réaction de la variable C_i (unité de $C_i \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$). $q_{Ci} = \frac{r_{Ci}}{X}$

- μ : vitesse spécifique de croissance (h^{-1}) $\mu = \frac{r_X}{X}$

- R_{SCi} : rendement de conversion du substrat en l'élément C_i ($Cmol.Cmol^{-1}$) $R_{SCi} = \frac{\Delta C_i}{\Delta S}$

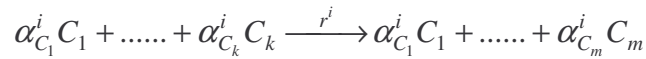
- QR : coefficient respiratoire

$$QR = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}}$$

IV.2.2. Calculs des bilans carbone et redox

Sur un système réactionnel dans lequel intervient n réactions avec m composés (C_j), les vitesses nettes de réaction sont obtenues par le produit entre le vecteur vitesse correspondant à chacune des réactions et la matrice stœchiométrique construite à partir des différents coefficients stœchiométriques ($\alpha_{C_j}^i$) relatifs à chacune des n réactions.

Soit l'ième réaction s'effectuant à la vitesse r_i



Le système est défini par :

- . Le vecteur de concentrations molaires des m composés $\vec{C} = (C_1, \dots, C_m)$
- . Le vecteur de densités volumiques de flux d'échange $\vec{\varphi} = (\varphi_1, \dots, \varphi_m)$
- . Le vecteur de vitesses nettes de conversion pour les m composés $\vec{r}_{net} = (r_{net}^1, \dots, r_{net}^m)$
- . Le vecteur de vitesses de réaction pour chacune des n réactions $\vec{r} = (r^1, \dots, r^n)$

Les vitesses nettes de conversion sont obtenues par le produit $\vec{r}_{net} = \vec{r} \cdot M$

Si l'on considère la matrice élémentaire donnant la composition élémentaire de chacun des composés selon leur formule brute faisant intervenir k éléments (E_i), nous obtenons alors :

$$|E| = \begin{vmatrix} \varepsilon_{C_1}^1 & \dots & \varepsilon_{C_1}^i & \dots & \varepsilon_{C_1}^k \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ \varepsilon_{C_j}^1 & \dots & \varepsilon_{C_j}^i & \dots & \varepsilon_{C_j}^k \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ \varepsilon_{C_m}^1 & \dots & \varepsilon_{C_m}^i & \dots & \varepsilon_{C_m}^k \end{vmatrix} \text{ pour les composés } C_j \text{ de formule brute } E_{\varepsilon_{C_j}^1}^1 \dots E_{\varepsilon_{C_j}^i}^i \dots E_{\varepsilon_{C_j}^k}^k$$

$\vec{r} \cdot M \cdot |E| = \vec{0}$ représente les vitesses nettes de conversion des éléments (nulle pour les systèmes biologiques).

A chacun des éléments (k) est alors associé un facteur λ_k .

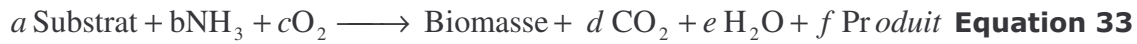
Si l'on considère le vecteur $\vec{\lambda} = (\lambda_1, \dots, \lambda_k)$, le produit entre le vecteur vitesse nette de conversion des éléments et la transposée du vecteur $\vec{\lambda}$ est nul, soit $\vec{r} \cdot M \cdot |E| \cdot \vec{\lambda}^T = \vec{0}$.

Par intégration dans le temps on peut également écrire $\int_{t_{init}}^{t_{final}} \vec{r} \cdot M \cdot |E| \cdot \vec{\lambda}^T dt = (\vec{C} \cdot |E| \cdot \vec{\lambda}^T)_{t_{init}}^{t_{final}} = \vec{0}$.

Par définition on appelle le terme $\sum_{i=1}^j (\lambda_i \cdot \varepsilon_{C_j}^i)$, coefficient de degré de réduction généralisé associé au composé C_j que l'on désigne par la lettre γ' . Ainsi pour un composé j de formule brute $E_{C_j}^1 .. E_{C_j}^i .. E_{C_j}^k$ pour un ensemble de coefficients donné, le coefficient de degré de réduction généralisé est égal à : $\gamma_j = \sum_{i=1}^j (\lambda_i \cdot \varepsilon_{C_j}^i)$.

Le bilan élémentaire généralisé s'écrit sous la forme : $\sum_{j=1}^m (r_j^{net} \cdot \gamma_j) = 0$.

D'une façon générale, la réaction biologique peut s'écrire de la façon suivante :



✓ Le bilan carbone est défini par $\sum_{j=1}^m (r_j^{net}) = 0$ où r_j^{net} est le flux net de conversion net du composé j exprimé en Cmole.h^{-1} . Soit

$$r_{\text{Substrat}}^{net} + r_{\text{Biomasse}}^{net} + r_{\text{CO}_2}^{net} + \sum r_{\text{Produit}}^{net} = 0$$

✓ Le bilan élémentaire généralisé s'écrit sous la forme : $\sum_{j=1}^m (r_j^{net} \cdot \gamma_j) = 0$

La valeur des coefficients $\lambda_C, \lambda_H, \lambda_O, \lambda_N$ est déterminée en éliminant de l'équation bilan les composés non mesurés (le bilan est donc limité à ces seuls éléments si l'on réduit la biomasse à la biomasse organique, c'est à dire à la biomasse totale réduite du taux de cendres). Le vecteur $\vec{\lambda}$ solution du système d'équations suivant permet d'éliminer l'eau, la source d'azote et le dioxyde de carbone du bilan généralisé : $\gamma_{H_2O} = 0$ soit $2\lambda_H + \lambda_O = 0$.

$$\gamma_{S_{az}} = 0 \text{ soit } 3\lambda_H \cdot \varepsilon_{S_{az}}^H + \lambda_N = 0 \text{ (Source d'azote NH}_3\text{)}$$

$$\gamma_{CO_2} = 0 \text{ soit } \lambda_C + 2\lambda_O = 0$$

avec $\lambda_H = 1$, valeur arbitraire et donc $\lambda_O = -2$, $\lambda_C = 4$ et $\lambda_N = -3$

Avec ces valeurs de $\lambda_C, \lambda_H, \lambda_O, \lambda_N$, le degré de réduction associé à chacun des composés est calculé en connaissant les indices de ces éléments dans la formule brute de la Cmole.

Résultats

Chapitre I : Mise en œuvre du micro-organisme.
Caractéristiques métaboliques de la souche.
Méthodologie de travail.

I. Introduction

Dans ce premier chapitre, nous avons voulu définir les conditions environnementales de travail afin que des perturbations du système ne viennent pas fausser l'analyse de l'effet des acides faibles sur la physiologie de *S. cerevisiae*. Pour cela, nous avons optimisé le milieu de culture et déterminé les caractéristiques métaboliques de la souche. Nous avons aussi défini une méthodologie de travail nous permettant d'analyser toutes les cultures de façon identique en posant toutes les hypothèses de calcul permettant d'analyser la réponse de la levure à un effecteur.

II. Optimisation du milieu de culture

Le milieu de culture doit fournir les éléments et les vitamines nécessaires à la consommation de la totalité du carbone assimilable dans le milieu. Si les milieux synthétiques décrits dans la littérature présentent une composition saline de base proche, ils sont relativement hétérogènes quant à leur composition en micro-éléments et en vitamines. Le milieu de culture utilisé dans les premières expérimentations est un milieu calculé à partir des résultats de van Hoek et coll. (2000b) permettant d'obtenir de fortes concentrations cellulaires, avec une solution de vitamines utilisée et développée au laboratoire. A partir du milieu de van Hoek et coll. (2000b) avec une concentration cellulaire finale (X_{finale}) de 130 g.L^{-1} , pour chaque élément E considéré, nous avons déterminé le rendement $R_{X/E}$ de transformation de l'élément en biomasse à partir de la concentration initiale en élément E (Tableau 7).

Tableau 7 : Valeurs des rendements de conversion des éléments en biomasse selon la publication de van Hoek et coll. (2000b).

Elément	$R_{X/E}$ (g de biomasse.mole de E ⁻¹)
N	100
S	1230
P	1674
K	1300
Mg	9214
Ca	526578
Fe	1031152
Mn	5428750
Zn	519333
Cu	5186398
Co	371269
Mo	5171200
Na	57961

$R_{X/E}$ représente la quantité de biomasse (g) que l'on peut théoriquement obtenir avec 1 mole de E. Ainsi, connaissant X_{finale} calculée à partir du rendement en biomasse, la

quantité d'élément E dans le milieu et $R_{X/E}$, un coefficient de limitation appelé facteur

d'excès (F_E), peut être calculé :

$$F_E = \frac{R_{X/E} \cdot C_E}{X_{finale}} . \quad \text{Equation 34}$$

Lorsque F_E est inférieur à 1, l'élément considéré est présent dans le milieu en quantité insuffisante pour constituer la biomasse voulue. Cet élément peut modifier voire limiter la croissance. Néanmoins, un facteur d'excès supérieur à 1 ne garantit pas l'absence de toute limitation car ce calcul est basé sur la composition de la biomasse sèche et peut éventuellement minimiser la teneur de certains ions. Le facteur d'excès de l'azote (F_N) utilisé est inférieur à 1 car la consommation des ions ammonium apportés par les sels est compensée par un ajout d'ammoniaque au cours de la croissance cellulaire (ions NH_4^+) par la régulation pH. Si il y a production d'acides organiques (acide acétique, pyruvique...) au cours de la croissance, ils ne peuvent que favoriser cet apport d'azote en faisant baisser le pH. Bien que F_N soit inférieur à 1, il ne peut pas y avoir une limitation par l'azote dans ces conditions.

Afin que l'environnement nutritionnel ne perturbe pas les expérimentations par son action limitante potentielle, le milieu de culture a été testé et amélioré pour tenir compte de la forte densité cellulaire produite en mode de culture discontinue alimentée.

II.1. Déroulement de la culture

Le réacteur a étéensemencé avec une concentration initiale de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, la première phase de croissance s'est déroulée sur 12 heures avec un débit exponentiel de glucose imposant un taux de croissance de $0,2 \text{ h}^{-1}$ et une consommation de l'éthanol produit lors des étapes de précultures. Pendant la suite de la culture, le débit de glucose appliqué est calculé pour obtenir un taux de croissance de $0,1 \text{ h}^{-1}$ (cf. § II.3.1., Matériel et Méthodes).

II.2. Résultats

A partir d'une concentration cellulaire de 30 g.L^{-1} , une carence en un élément est identifiée par l'évolution de la p_{O_2} , puis avec un temps de retard par l'éthanol présent dans les gaz de sortie et par conséquent, par la valeur du coefficient respiratoire (QR). En effet, dès qu'une limitation survient, la vitesse spécifique de respiration (q_{O_2}) diminue et le coefficient respiratoire augmente (Figure 22). Les sels et oligo-éléments préparés concentrés stérilement sont injectés un à un jusqu'à l'obtention d'une réponse sur la vitesse de respiration r_{O_2} , c'est-à-dire un retour vers la valeur qu'elle aurait eu sans limitation nutritionnelle et une consommation de l'éthanol produit. Un délai de 15 minutes est laissé entre chaque ajout de sel réalisé. Le manganèse s'est révélé être le premier élément limitant pour la croissance cellulaire.

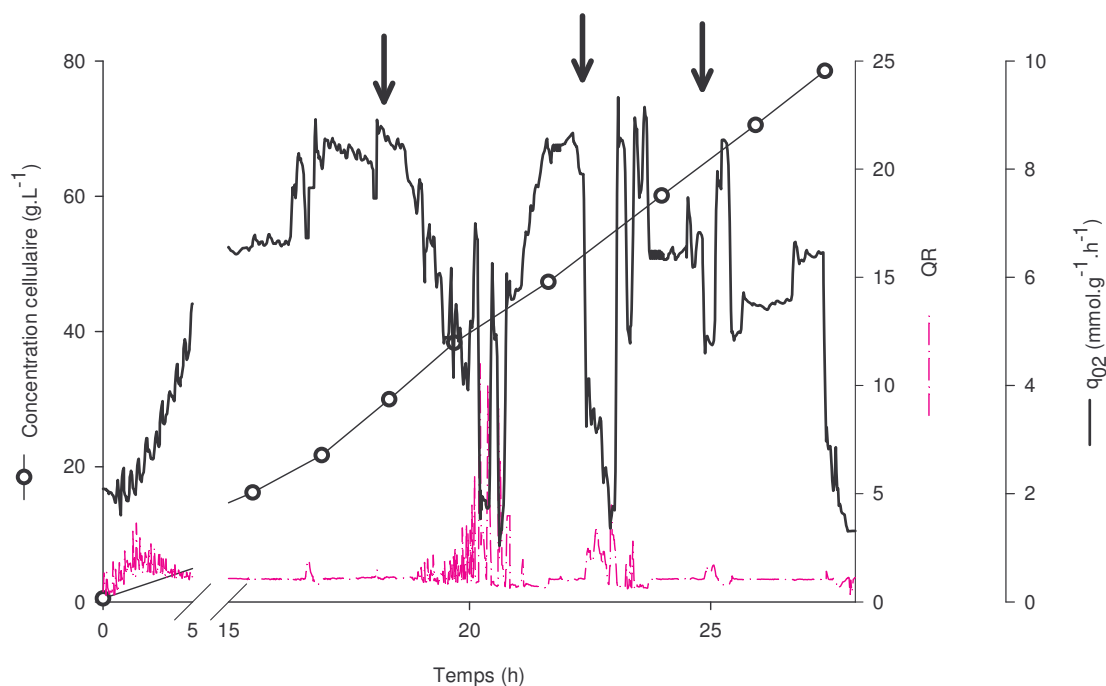


Figure 22 : Evolution de la concentration cellulaire, de la vitesse spécifique de respiration (q_{O_2}) et du coefficient respiratoire (QR) en fonction du temps. Les flèches indiquent les limitations nutritionnelles.

La deuxième limitation a eu lieu à une concentration cellulaire de 53 g.L^{-1} , de façon identique à la première limitation, les sels principaux et oligo-éléments sont injectés un à un. Le molybdène s'est avéré être le deuxième élément limitant de la croissance cellulaire.

Une troisième limitation a été visible à 65 g.L^{-1} de biomasse, l'ajout de 10 mL de la solution de vitamines a suffi à combler la limitation ; une ou plusieurs vitamines sont donc limitantes.

II.3. Conclusion

Une recherche bibliographique sur les vitamines montre que deux des sept vitamines utilisées sont en quantités très insuffisantes par rapport à la demande des levures : il s'agit de l'acide nicotinique et du myo-inositol (Tableau 8). D'autres vitamines pourraient être légèrement déficientes pour la croissance cellulaire comme par exemple l'acide aminobenzoïque ou l'acide pantothénique. Pour pallier à cette carence, au lieu d'être rajoutée tous les 20 g.L^{-1} de biomasse, la solution de vitamines sera injectée tous les 10 g.L^{-1} de biomasse formée.

Tableau 8 : Demande nutritionnelle en vitamines de la levure *S. cerevisiae* et apport réalisé avec la solution de vitamines pour un ajout tous les 20 g.L⁻¹ de biomasse formés (Burrows, 1970).

Vitamines	Demande ($\mu\text{g.g de biomasse}^{-1}$)		Apport réalisé par notre milieu ($\mu\text{g.g de biomasse}^{-1}$)
	minimum	maximum	
Acide aminobenzoïque	16	175	10
Biotine	0,5	36	2,5
Myo-inositol	3000	5000	1250
Acide nicotinique	200	700	50
Acide pantothénique	69	280	50
Pyridoxine	16	65	50
Thiamine	9	89	50

Connaissant pour les différents éléments limitants la quantité consommée ainsi que la quantité de biomasse produite au moment de la limitation, les nouveaux rendements en biomasse pour le manganèse et le molybdène ont pu être réévalués, les valeurs des nouveaux rendements sont respectivement de 3 706 000 g.mol⁻¹ et de 1 898 000 g.mol⁻¹. Le milieu salin initial étant à la limite de la solubilité des sels présents, les éléments limitants sont ajoutés dans le milieu d'alimentation qui a été redéfini à partir des nouveaux rendements obtenus (Tableau 9).

Tableau 9 : Composition du nouveau milieu salin d'alimentation.

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
MgSO ₄ , 7H ₂ O	36,1
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,09
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,3
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1,1
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,3
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,5
H ₃ BO ₃	0,03
MnSO ₄ , H ₂ O	0,1
FeSO ₄ , 7H ₂ O	3
NaCl	10
KCl	55,8
H ₃ PO ₄	90,7
H ₂ SO ₄	212,5

III. Validation du milieu de culture et paramètres métaboliques de la souche

III.1. Mise en œuvre

Un contrôle PID de l'apport du substrat basé sur la mesure du coefficient respiratoire (QR) a été mis en place de sorte à maintenir métabolisme purement oxydatif ($QR = 1$) (cf. § II.3.2., Matériel et Méthodes). Il permet de contrôler l'apport de glucose afin d'éviter la bascule vers le métabolisme fermentaire, ce qui diminuerait les rendements de conversion du substrat en biomasse. La pompe d'ajout du milieu salin d'alimentation est couplée à la pompe d'apport de glucose et son débit est toujours équivalent au dixième de celui du substrat.

Ce type de conduite a permis de calculer les caractéristiques de la souche (taux de croissance critique (μ_c) et les rendements de conversion) puis la culture a été poursuivie avec des taux de croissance plus faibles pour tester les potentialités du milieu de culture en terme de concentration cellulaire. Pour cela, la culture a été réalisée en trois phases distinctes : la première phase a est réalisée jusqu'à l'obtention de 15 g.L^{-1} de biomasse où la croissance est contrôlée par un débit exponentiel de glucose imposant un taux de croissance de $0,2 \text{ h}^{-1}$ (Figure 23). La seconde phase b correspond à un contrôle PID de l'apport du glucose jusqu'à l'obtention de 50 g.L^{-1} de biomasse. La culture est ensuite terminée en imposant deux taux de croissance successifs inférieurs à μ_c afin d'éviter une limitation par le transfert d'oxygène qui masquerait une potentielle limitation nutritionnelle (phase c).

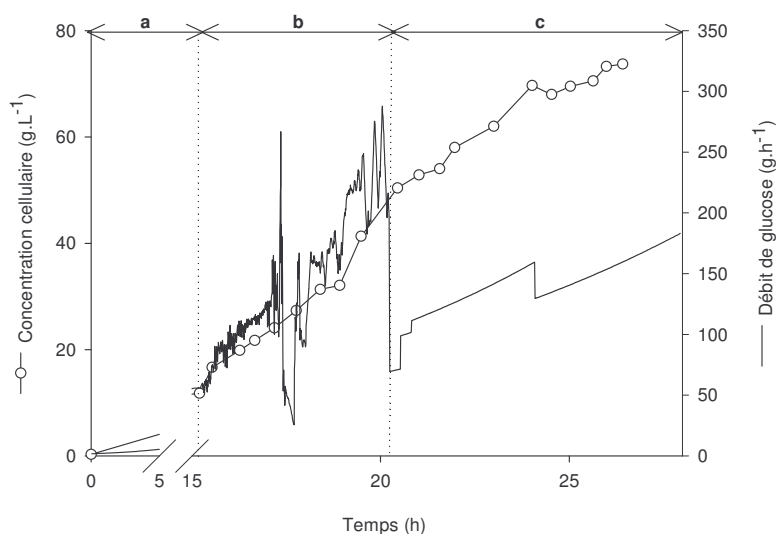


Figure 23 : Evolution de la concentration cellulaire et du débit de glucose selon le mode de conduite de la culture. Phase a : débit exponentiel de glucose $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$, phase b : contrôle PID du débit de sucre et phase c : débits exponentiels de glucose pour des taux de croissance de $0,1 \text{ h}^{-1}$ et $0,05 \text{ h}^{-1}$.

III.2. Résultats

III.2.1. Potentialités du nouveau milieu de culture

Lors de la précédente culture, nous pouvions nous demander si les limitations nutritionnelles n'avaient pas été levées suite à un effet cumulatif de tous les sels ajoutés dans le milieu après les trois limitations. Le nouveau milieu contenant les deux sels identifiés comme limitants et les vitamines a été testé. La concentration cellulaire a atteint la valeur de 75 g.L^{-1} sans qu'aucune limitation nutritionnelle n'apparaisse. Nous pouvons conclure que les nouveaux milieux salins satisfont les demandes nutritionnelles de la levure.

Durant toute la culture, le métabolisme est resté purement oxydatif démontré par un coefficient respiratoire proche de 1, l'absence d'accumulation d'éthanol dans le milieu de culture et le maintien d'une concentration résiduelle en acétate de 60 mg.L^{-1} . La concentration résiduelle en glucose est de l'ordre de 40 mg.L^{-1} tout au long de la culture ; la totalité du glucose apporté dans le fermenteur est consommée.

III.2.2. Caractéristiques de la souche

III.2.2.a. Composition de la biomasse

Afin de mieux caractériser la biomasse, sa composition élémentaire a été déterminée par analyse chimique à différents temps de culture pendant le régime stabilisé à un taux de croissance de $0,1 \text{ h}^{-1}$ (cf. § III.10., Matériel et méthodes). La composition de la biomasse est relativement constante au cours de cette phase et les résultats sont présentés dans le tableau 10. Cette valeur de composition de la biomasse sera prise pour les calculs ultérieurs.

Tableau 10 : Composition élémentaire moyenne de la biomasse pour un état physiologique donné et stabilisé, masse de la Cmol, degré de réduction, pourcentage de cendres et écart-type sur chaque élément.

	Cmol				Cmol	Degré	Cendres
	C	H	O	N	(g)	de réduction	(%)
Composition élémentaire	1	1,65	0,54	0,19	27,51	4,01	9,4
Ecart-type	x	0,062	0,007	0,006	0,639	0,034	2

III.2.2.b. Rendements de conversion

Les rendements de conversion de substrat en produits notamment en biomasse sont des paramètres importants pour la compréhension et la caractérisation du métabolisme microbien. L'équation complète entre l'oxydation du glucose et la formation de biomasse permettant de calculer les rendements globaux est la suivante (**Equation 35**) :



Les valeurs des rendements globaux bruts (c'est-à-dire obtenus sans traitement des données) sont consignées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Valeurs des différents rendements globaux bruts de conversion du substrat en Cmol.Cmol⁻¹ obtenus pour un régime oxydatif, à pH 5, à $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Rendements globaux	Cmol.Cmol ⁻¹
R_{SX}	0,56
R_{SCO_2}	0,48
R_{SO_2}	0,46

Les résultats obtenus sont cohérents avec le métabolisme oxydatif observé. En effet, le coefficient respiratoire théorique calculé à partir des rendements ($QR = \frac{R_{SCO_2}}{R_{SO_2}}$) a une valeur de 1,04. A titre de comparaison, les valeurs obtenues par Guillou (1996) donnent un R_{SX} de 0,545 Cmol.Cmol⁻¹ pour des cultures réalisées en mode continu sur une souche de laboratoire (CBS 8066), valeur proche de celle que nous avons obtenue.

Aucun acide n'est excrété dans le milieu par la levure, l'ajout de base dans le réacteur est uniquement lié à la croissance cellulaire par la consommation de la source d'azote ammoniacal. Nous pouvons ainsi calculer directement le rapport N/C correspondant à la quantité d'azote incorporée par Cmole de biomasse à partir des apports de glucose (ΔS^{ajout}) et d'azote (régulation pH, ΔNH_3^{ajout}) et de la production de

dioxyde de carbone dans le réacteur ($\Delta CO_2^{produit}$). Ce rapport $N/C = \frac{\Delta NH_3^{ajout}}{\Delta S^{ajout} - \Delta CO_2^{produit}}$

est de 0,2 mole.Cmole⁻¹ tout au long de la culture. Cette valeur correspond à la mesure effectuée sur la biomasse (cf. § précédent) et confirme la validité de nos mesures en ligne.

III.2.2.c. Taux de croissance critique

La phase de croissance sous contrôle PID du flux de substrat permet d'obtenir le taux de croissance critique de la souche qui est de 0,27 h⁻¹ pour une vitesse spécifique de consommation d'oxygène critique ($q_{O_2 \text{ critique}}$) de 8 mmol.g⁻¹.h⁻¹.

III.3. Conclusion

Cette première approche nous a permis de développer un milieu de culture non limitant pour la croissance permettant d'obtenir 75 g.L^{-1} de biomasse en complétant le milieu initial par du molybdène et du manganèse. Les vitamines s'étant montrées limitantes pour la croissance, la stratégie d'apport des vitamines a aussi dû être améliorée en augmentant la fréquence d'apport. Le nouveau milieu de culture ainsi défini a permis d'étudier les caractéristiques intrinsèques du métabolisme oxydatif de la souche. En particulier, la valeur des différents rendements permettra de prédire les vitesses maximales de consommation de substrat permettant de satisfaire les potentialités maximales de transfert d'oxygène caractérisées par un k_{La} voisin de 2000 h^{-1} .

IV. Méthodologie de travail

IV.1. Conduites de la fermentation

Toutes les cultures décrites dans ce travail sont conduites de façon similaire afin d'éliminer des réponses cellulaires qui proviendraient de variations environnementales et/ou de conduites de fermentation différentes. Après l'ensemencement, des débits exponentiels de glucose et de sels sont appliqués pour assurer un taux de croissance de $0,2 \text{ h}^{-1}$. Pendant cette première phase, il y a légère production et consommation d'éthanol (Figure 24) et nous observons des oscillations métaboliques sur le QR qui sont largement décrites dans la littérature et principalement caractérisées par une variation périodique de la vitesse spécifique de respiration (Sonnleitner, 1991).

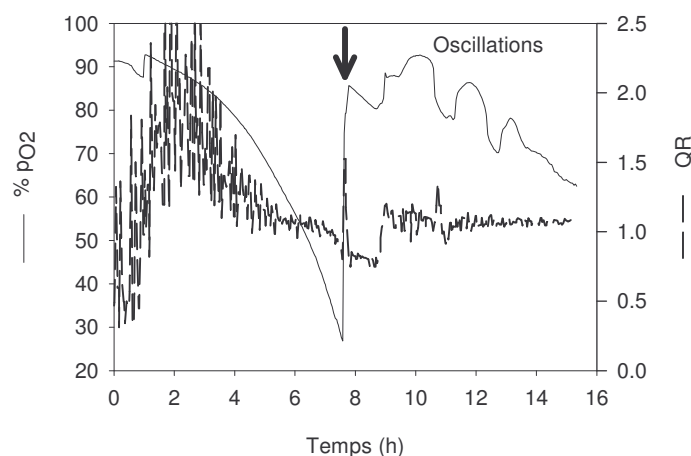


Figure 24 : Evolution de la pO₂ et du coefficient respiratoire sur les quinze premières heures de la culture. La flèche désigne l'augmentation de l'agitation.

Ces oscillations ont toujours été observées en début de nos cultures aux alentours de 10 heures, elles s'atténuent au cours du temps pour totalement disparaître vers 15 heures de culture. Les oscillations, avec un coefficient de transfert d'oxygène constant sont aussi visualisées par des oscillations de la concentration en oxygène dissous (Figure 24). Suite à la légère augmentation du coefficient respiratoire qui passe de 0,8 (caractéristique de la consommation d'éthanol) à 1 vers 9 heures de culture, elles pourraient s'expliquer par l'épuisement de l'éthanol provenant des précultures et le passage à un métabolisme purement oxydatif sur glucose. Le coefficient respiratoire ne subit que de très faibles variations durant ces oscillations et reste à une valeur proche de 1.

La culture est poursuivie à un taux de croissance identique et dès l'obtention de 30 g.L^{-1} de biomasse, le taux de croissance de travail est appliqué ; dans le cas présenté ici, il a été imposé à une valeur de $0,1 \text{ h}^{-1}$ pendant 6 heures (Figure 25).

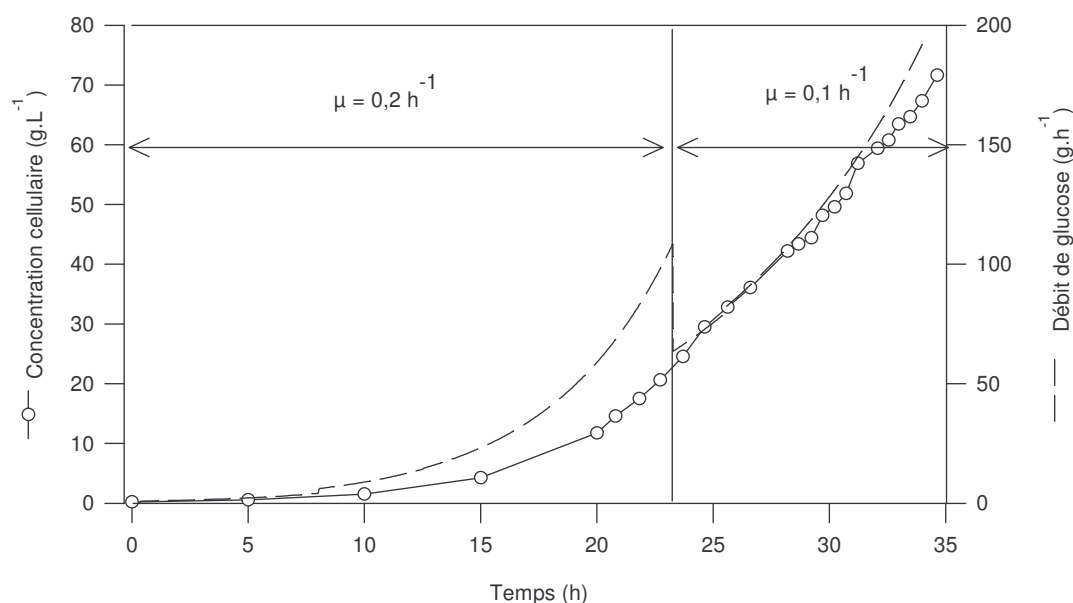


Figure 25 : Evolution de la concentration cellulaire et du flux d'apport de glucose en fonction de la conduite de la culture. Conduite standard des cultures réalisées avec deux phases de croissance, une première rapide à un taux de croissance de $0,2 \text{ h}^{-1}$ et une phase où le taux de croissance est diminué à la consigne de travail, ici à $0,1 \text{ h}^{-1}$.

IV.2. Définition des paramètres des cultures

IV.2.1. Cultures de type fed-batch

Dans la littérature, la majorité des cultures pour l'étude des effets des acides faibles ont été réalisées en fioles d'Erlenmeyer ou en cultures continues. La concentration cellulaire pour ces différents modes de culture est inférieure à 50 g.L^{-1} . Des cultures en mode fed-batch permettent d'obtenir des concentrations cellulaires voisines de 80 à 100 g.L^{-1} . Ce mode de culture et les fortes concentrations cellulaires permettent d'intensifier les réponses et les flux, de minimiser l'incertitude des mesures et donc de mieux quantifier la dynamique des réponses. En utilisant des cultures de type fed-batch, nous pourrions alors visualiser la consommation des différents acides avec la répartition de l'acide intracellulaire et extracellulaire tout en suivant leurs dynamiques de disparition. Ce type de conduite nous permet aussi de simuler un procédé industriel et donc d'intégrer dans l'étude de possibles interactions entre les dynamiques physiques et les dynamiques biologiques. De plus, nous pourrions tester l'effet d'un deuxième stress sur des levures qui auront la « mémoire » d'un premier stress par opposition à un procédé de type chimostat où la biomasse est constamment renouvelée.

Par ailleurs, un procédé de ce type permet de rester dans des conditions purement oxydatives, sans répression catabolique avec un état physiologique parfaitement stabilisé. Nous pouvons aussi nous affranchir des oscillations spontanées qui surviennent en chémostat (Sonnleitner, 1991) et avec des conditions opératoires (pH, température, environnement gazeux...) parfaitement maîtrisées contrairement aux cultures en fioles d'Erlenmeyer.

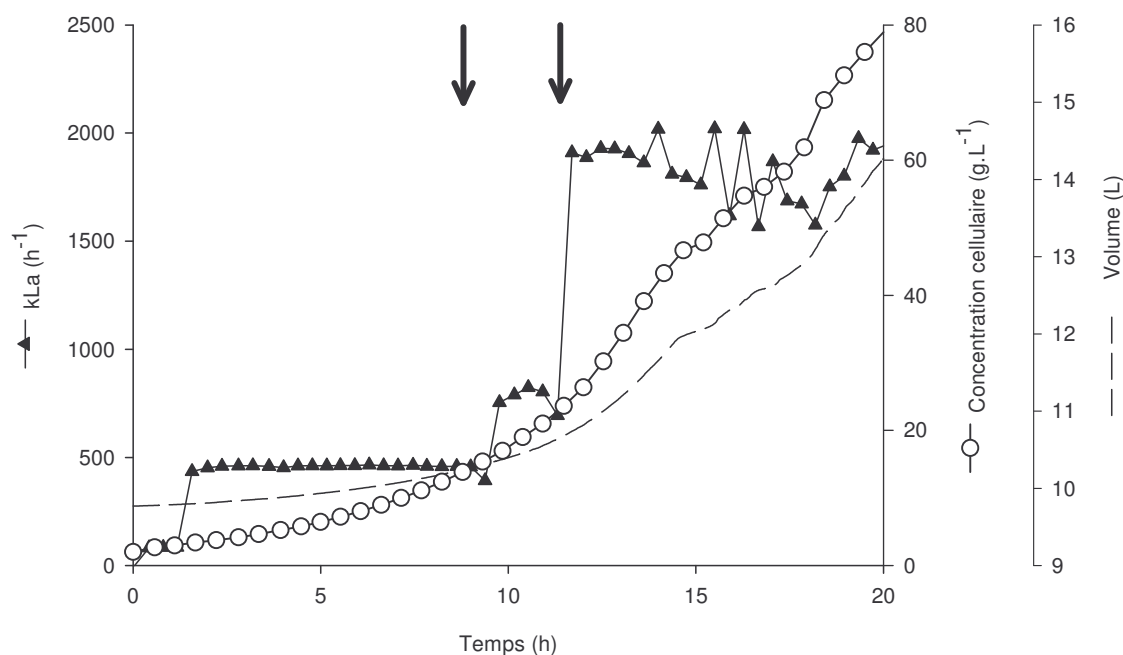


Figure 26 : Evolution du k_La , de la croissance cellulaire et du volume du fermenteur pour une conduite de type fed-batch. Les flèches indiquent des changements dans les conditions d'aération et d'agitation.

La réalisation des cultures de définition du milieu et de l'étude des caractéristiques du métabolisme de notre souche ont permis de connaître les capacités de transfert de notre réacteur (Figure 26). Comme calculé dans le paragraphe suivant, notre procédé sera limitant pour de trop fortes concentrations cellulaires ; en effet, le volume réactionnel sera trop élevé et le transfert d'oxygène deviendra l'élément limitant du procédé. Afin qu'une incapacité de transférer l'oxygène ne vienne pas perturber le métabolisme des levures, nous avons décidé d'étudier l'effet des acides faibles dans une gamme de concentrations cellulaires comprise entre 40 et 70 g.L⁻¹.

IV.2.2. Pourquoi travailler à des taux de croissance faibles ?

Les taux de croissance de travail nous sont aussi imposés par les contraintes de transfert du réacteur. En effet, pour des concentrations cellulaires élevées et pour des taux de croissance proches du μ_c (et donc $q_{O_2 \text{ critique}}$), le transfert d'oxygène deviendrait limitant et le métabolisme de la levure changerait.

Des taux de croissance trop faibles (inférieurs à $0,05 \text{ h}^{-1}$) ne nous permettraient pas de connaître les dynamiques de réponse aux acides qui seraient imposées par des dynamiques de croissance très faibles.

Or, nous voulons pouvoir quantifier le métabolisme de réponse à l'acide en conditions parfaitement maîtrisées, deux taux de croissance ont donc été choisis : $0,05 \text{ h}^{-1}$ et $0,1 \text{ h}^{-1}$.

Dans ces conditions opératoires, en fin de culture, pour une concentration en biomasse proche de 70 g.L^{-1} , la vitesse de croissance est égale à $r_x = \mu.X \approx 3,5 - 7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, soit

une vitesse de consommation d'oxygène de $r_{O_2} = \mu.X \cdot \frac{R_{SO_2}}{R_{SX}} \approx 3,4 - 6,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pouvant

être satisfaite avec un coefficient global de transfert d'oxygène compris entre 500 et 1000 h^{-1} . Suite aux pulses d'acide de notre étude comme nous le verrons dans le paragraphe III.2. (Chapitre II, Résultats), la demande en oxygène est multipliée par 2, cette demande sera alors à la limite de notre procédé (2000 h^{-1}).

IV.2.3. Régime stabilisé pour l'étude des acides faibles

Dans toutes nos cultures, les pulses d'acides réalisés dans le réacteur sont toujours appliqués quand le métabolisme de la levure est stabilisé. Ainsi, pour le premier pulse effectué, le taux de croissance de travail est imposé depuis trois heures et toutes les variables cinétiques sont stables (la vérification s'appuie sur l'estimation en ligne du taux de croissance sur la base du CO_2 produit, du rendement carbone et du rapport N/C).

Comme nous le verrons dans les chapitres II, III et IV, (cf. Résultats), pour certaines cultures, deux pulses d'acides seront effectués successivement. Le deuxième pulse est réalisé alors que toutes les variables cinétiques sont revenues à des valeurs caractéristiques d'un métabolisme stabilisé. Le temps de génération est compris entre 7 et 14 heures pour nos cultures, or nous avons choisi de laisser une durée entre les deux pulses voisine de quatre heures, les variables macroscopiques étant toutes revenues à leurs valeurs précédentes le pulse. Un des objectifs de l'étude sera de vérifier si les analyses plus spécifiques de caractérisation physiologique infirment l'analyse cinétique en ligne. La majorité des mesures réalisées à *posteriori* nous indiquent qu'effectivement la levure était dans un état physiologique correspondant à celui qu'elle avait avant le premier pulse (sucres de réserves intracellulaires, métabolites intracellulaires et analyses transcriptomiques). Ces résultats seront présentés dans les chapitres II et VI (Résultats).

IV.3. Calcul du pH_i

Beaucoup d'approches sont décrites dans la littérature pour déterminer le pH_i de la levure. Ces techniques bien que largement répandues et défendues par leurs auteurs, sont problématiques et ne sont que très peu applicables dans nos conditions de culture.

C'est pourquoi nous avons décidé de ne pas utiliser les différents protocoles décrits pour accéder à ce pH_i mais de le calculer avec les hypothèses intrinsèques de ces protocoles. Dans ce paragraphe, dans un premier temps, seront exposées les techniques de mesures du pH_i ainsi que leurs limites d'applications, puis sera développée notre argumentation pour le calcul du pH_i .

IV.3.1. Problèmes liés à la mesure du pH_i

La méthode la plus commune de mesure du pH_i est basée sur l'équilibre de distribution des différentes formes de l'acide de part et d'autre de la membrane pour des acides marqués (Kotyk, 1963 ; Rottenberg, 1979). Bien que largement utilisée, cette méthode a des applications limitées puisque les mesures sont faites après de nombreuses étapes de centrifugation et d'importants délais d'attente (75 minutes) où le métabolisme de la levure peut changer et en particulier l'énergétique cellulaire requise pour la régulation de ce pH intracellulaire. D'autres difficultés essentielles avec cette méthode incluent l'effet inhibiteur des acides faibles sur la physiologie cellulaire et la compartimentation des acides faibles à l'intérieur de la cellule (Cole et Keenan, 1986).

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est aussi utilisée pour mesurer le pH_i avec cependant un équipement complexe et onéreux (Gillies et coll., 1981 ; Nicolay et coll., 1982).

La mesure du pH_i peut aussi être réalisée en utilisant des microélectrodes sensibles au pH ; cette technique est destructive et non utilisable pour une large population de micro-organismes (Bracey et coll., 1998b).

Beaucoup d'attentes ont donc été faites dans l'utilisation de sondes ou colorants fluorescents dépendants du pH pour mesurer le pH_i chez les levures (Slavik, 1982) et chez les bactéries (Molenaar et coll., 1991). Les préfluorochromes perméables à la membrane comme la fluorescéine diacétate (FDA) et la 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) peuvent être incorporés dans le cytosol où ils sont hydrolysés par des estérases intracellulaires en une forme polaire qui devient fluorescente (la CFDA est hydrolysée en carboxy-fluorescéine (CF)). Cette fluorescence est dépendante du pH et est à la base de toutes les méthodes de mesure du pH_i . Utiliser des techniques fluorescentes avec des sondes comme la CFDA a de nombreux avantages : la rapidité, le coût moindre et la non destruction des cellules. Néanmoins, ces techniques montrent une fuite de la fluorescence de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur qui augmente le bruit de fond et fausse les calculs ultérieurs (Breeuwer et coll., 1994).

Une solution a été proposée en utilisant un dérivé ester du fluorochrome qui après avoir pénétré dans la cellule forme un conjugué avec des amines aliphatiques des protéines intracellulaires, ce qui stabilise le fluorochrome à l'intérieur de la cellule (Weston et Parish, 1990 ; Breeuwer et coll., 1996). Cependant, beaucoup de

compartiments de la levure contiennent des estérases et le fluorochrome est préférentiellement hydrolysé dans les vacuoles ; la mesure du pH_i résulte donc d'une moyenne des différents compartiments de la levure (Slayman et coll., 1994).

Un autre indicateur fluorescent a été étudié : la pyranine (Peña et coll., 1995), qui est introduite par électroporation dans la cellule et qui est soumise à une fuite moins élevée que pour les fluorochromes précédemment cités (2 % par heure). Par ailleurs, il semblerait que la pyranine ne traverse pas la membrane vacuolaire, ce qui donnerait une meilleure estimation du pH_i . Cependant, lors de l'étape d'électroporation, une fuite de potassium vers le milieu extérieur est observée ce qui pourrait légèrement fausser la mesure (Peña et coll., 1995).

En dépit de tous ces résultats positifs utilisant les sondes fluorescentes pour mesurer le pH_i , peu d'études sont décrites pour la mesure du pH_i dans des conditions de croissance pour des états physiologiques précis (Guldieldt et Arneborg, 1998 ; Bracey et coll., 1998b). Cependant, ces dernières études ne correspondent pas à des mesures instantanées du pH_i puisque les cellules prélevées de leur milieu de croissance sont resuspendues dans un tampon citrate/phosphate contenant le fluorochrome. Le temps d'incubation est de 30 minutes et il ne peut pas être réduit à un temps plus court de part la nature complexe de la membrane cellulaire qui limite la diffusion du fluorochrome à l'intérieur de la cellule (Bracey et coll., 1998b). Durant ce temps de latence, la cellule change de métabolisme et la mesure finale du pH_i ne correspond pas à l'état physiologique de la levure dans les conditions de culture précédant la mesure.

IV.3.2. Récupération du surnageant de culture

Dans notre cas, l'estimation du pH_i à partir d'échantillons de cultures à concentration cellulaire élevée est rendue difficile par l'évolution très rapide de l'environnement des cellules dans ces échantillons. L'épuisement de l'oxygène dissous dans le milieu survient presque immédiatement après le prélèvement des cellules du fermenteur. L'arrêt de la respiration se répercute directement sur les valeurs des composantes de la force proton motrice et ceci peut modifier la distribution transmembranaire d'un acide faible sur laquelle sont basées les méthodes de mesures hors ligne du ΔpH (Kashket, 1985).

Pour vérifier ce phénomène, nous avons comparé les concentrations en acide propionique et en métabolites dans le surnageant de culture entre deux modes de récupération du surnageant. Le premier mode consiste en une centrifugation ($10000 \times g$, 5 min) et l'autre mode réside dans le système de filtration tangentielle à l'aide d'un module de filtration (Applikon) monté sur une boucle de recirculation du milieu fermentaire (cf. § II.3.3., Matériel et Méthodes).

Les concentrations en acide propionique (acide dont la partition est fonction du pH_i , Verduyn et coll., 1990a) mesurées dans la phase liquide sont différentes pour les deux méthodes de récupération. En effet, elles sont supérieures pour la méthode de centrifugation avec un écart d'autant plus important que la concentration exocellulaire est élevée (écart de 46 % pour les fortes concentrations contre 20 % pour les faibles) (Figure 27). Cette observation est similaire pour l'éthanol qui n'est pas détecté par filtration tangentielle mais dont la concentration dans les échantillons centrifugés est voisine de 70 mg.L^{-1} . Cette production d'éthanol lors d'une séparation par centrifugation corrobore l'épuisement du glucose dans ces échantillons alors que sa concentration est de 40 mg.L^{-1} dans les perméats de microfiltration. Au cours des étapes de centrifugation, la levure consommerait le glucose, produirait de l'éthanol et éventuellement épuiserait son pool de carbone glycolytique selon un métabolisme fermentaire.

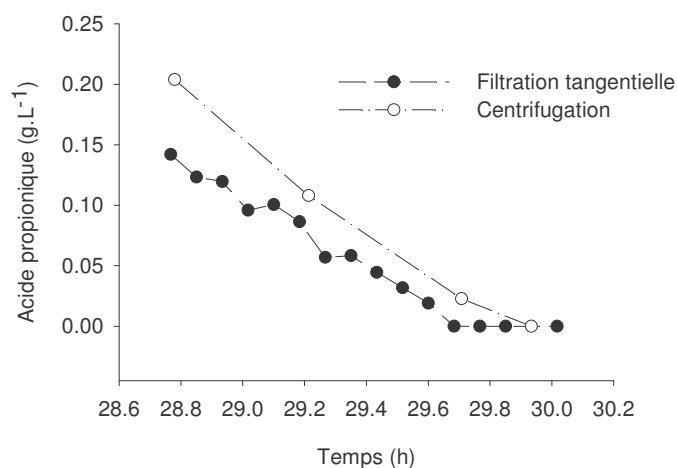


Figure 27 : Evolution de la concentration exocellulaire en acide propionique au cours du temps et en fonction des deux modes de prélèvements.

Le perméat issu du module de filtration tangentielle représente plus fidèlement la composition instantanée de l'environnement lié à l'activité physiologique de la levure dans le fermenteur que ne le permet le surnageant d'un échantillon centrifugé. C'est à partir de ces mesures que seront effectués tous les calculs et analyses.

IV.3.3. Détails du calcul du pH_i

Pour calculer le pH_i , nous nous sommes basés sur la technique utilisée par Rottenberg (1979) qui repose sur la partition de l'acide entre l'intérieur de la cellule et le milieu extérieur. Cependant, cette technique repose sur l'utilisation d'un acide marqué injecté après la phase de croissance ; nous avons décidé d'utiliser directement les concentrations en acide mesurées dans les perméats de culture par rapport à la quantité d'acide injectée au moment du pulse.

Les acides faibles s'accumulent à l'intérieur de la cellule et le pH intracellulaire peut être estimé, si le facteur d'accumulation de l'acide est connu pour un acide faible se dissociant sous la forme :



La loi d'Henderson-Hasselbach lie les concentrations des deux formes AH et A⁻ au pH dans chaque compartiment par les relations :

$$pH_i = pKa + \log \frac{[A^-]_{in}}{[AH]_{in}} \text{ dans la cellule} \quad \textbf{Equation 36}$$

$$pH_{exo} = pKa + \log \frac{[A^-]_{exo}}{[AH]_{exo}} \text{ dans le milieu de culture} \quad \textbf{Equation 37}$$

avec par définition, $[A] = [AH] + [A^-]$.

Le pH résulte de l'activité électrochimique de l'ion hydrogène et non de sa concentration, car seuls les ions électrochimiquement actifs participent réellement à l'acidité. Ce phénomène est traduit par l'expression suivante, valable pour tous les ions :

$$pH = -\log a_{H^+} = -\log(\gamma_{H^+} \cdot [H^+]) \text{ où } a_{H^+} \text{ est l'activité, } \gamma_{H^+} \text{ le coefficient d'activité et } [H^+]$$

la concentration en protons. Le coefficient d'activité dépend, non seulement de la concentration des ions hydrogène, mais également des autres ions présents en solution,

c'est à dire de la force ionique globale de la solution définie par $I = \frac{1}{2} \cdot \sum_j c_j \cdot z_j^2$ où c_j est

la concentration et z_j la charge du composé j . Cependant, dans le cas de la mesure de pH, il y a concordance entre la méthode de mesure couramment utilisée (détermination potentiométrique) permettant de mesurer directement l'activité de l'ion hydrogène, et le pH lui-même, qui dépend de l'activité de l'ion hydrogène. Ainsi, en toute rigueur, la concentration devrait être substituée par l'activité, le cytosol cellulaire étant très éloigné d'une « solution idéale » infiniment diluée. L'impossibilité d'accéder au coefficient d'activité intracellulaire du proton, la notion de concentration sera retenue comme dans la plupart des études reportées dans la littérature.

La littérature précise que la membrane est imperméable à la forme ionique et perméable à la seule forme protonée de l'acide. La diffusion de la forme protonée vers l'intérieur de la cellule dépendra du gradient électrochimique préexistant et donc de la différence de potentiel électrochimique de l'espèce de part et d'autre de la membrane. Dans des conditions de température et pression constante, les potentiels chimiques sont

égaux aux enthalpies libres molaires partielles pour chacune des espèces chimiques $\mu_i = g_i = h_i - Ts_i$ avec $\mu_i = \mu_i^0 + R.T.\ln(\gamma_i \cdot \frac{C_i}{C_i^0})$ où C_i^0 et μ_i^0 sont la concentration et le potentiel chimique dans l'état standard de l'espèce i et γ_i est le coefficient d'activité. L'équilibre de diffusion est atteint lorsque la différence de potentiel chimique est nulle. Ici, également, la connaissance des coefficients d'activité est nécessaire pour caractériser l'état d'équilibre et leur méconnaissance impose d'approcher l'activité par la concentration. Dans ce cas, l'équilibre de diffusion sera considéré atteint lorsque les concentrations intra et extracellulaires de la forme protonée de l'acide seront égales, soit $[AH]_{\text{exo}} = [AH]_{\text{in}}$ (Kell et coll., 1981).

La concentration en acide intracellulaire totale se calcule à partir de la quantité d'acide injectée, de la quantité d'acide contenue dans le surnageant de culture (obtenue à partir de la mesure en CPG), du volume cytosolique et du volume de liquide dans le réacteur. Cette concentration est définie par :

$$[A]_{\text{in}} = \frac{\text{Quantité d'acide injectée} - \text{Quantité d'acide dans le surnageant}}{V_{\text{cytosolique}}} \quad \text{Equation 38}$$

Le volume cytosolique est obtenu par une mesure thermogravimétrique (cf. § III.8., Matériel et Méthodes) qui est réalisée pour chaque culture et pour les différentes conditions de stress acide. Les valeurs obtenues par thermogravimétrie sont voisines de 0,6 g d'eau par g de biomasse humide, ce facteur est appelé a, avec pour définition :

$$a = \frac{H_2O^i}{H_2O^i + ms} \quad (\text{avec } H_2O^i : \text{pourcentage d'eau intracellulaire et ms : masse sèche}).$$

Le volume cytosolique se définit alors comme la part d'eau dans la biomasse et peut

$$\text{s'écrire : } V_{\text{cytosolique}} = \frac{V_{\text{réacteur}} \times [X]}{\rho} \times \left(\frac{a}{1-a} \right) \quad \text{avec } \rho, \text{ la masse volumique des cellules, qui}$$

sera prise égale à la valeur 1.

Le volume cytosolique obtenu dans nos différentes conditions est de l'ordre de 1,5 mL.g de biomasse⁻¹. Cette valeur est proche des données de la littérature avec des valeurs comprises entre 1,4 et 1,9 mL.g de biomasse⁻¹ pour *S. cerevisiae* et *Debaryomyces hansenii* (Henriques et coll., 1997 ; Warth, 1988 ; Larsson et coll., 1990). La différence avec le volume cellulaire de 1,9 mL.g⁻¹ s'explique par le fait que nos mesures ne tiennent pas compte des polyols contenus dans la cellule alors que Larsson et coll. (1990) les considèrent comme participant pleinement au volume cytosolique. De ce fait, nous surestimons légèrement les concentrations intracellulaires.

Le facteur d'accumulation pour un acide, souvent utilisé dans la littérature, s'écrit sous la forme : $F = \frac{[A]_{in}}{[A]_{exo}}$ (**Equation 39**) (Casio et coll., 1987).

Par conséquent, le pH intracellulaire peut être exprimé sous la forme :

$$pH_i = pKa + \log(F(1 + 10^{pH_{exo} - pKa}) - 1) \quad \text{Equation 40}$$

Dans le tableau 12 sont présentées les valeurs des facteurs d'accumulation théoriques pour différents acides faibles pour des pH_i de 7. Dans la littérature, les pH_i couramment indiqués sont de l'ordre de 6,8-7,2 (Navon et coll., 1979 ; Nicolay et coll., 1982). Ainsi, plus les pH_{exo} sont faibles, plus le facteur d'accumulation est élevé.

Tableau 12 : Valeurs des facteurs d'accumulation théoriques calculés pour un pH cytosolique de 7 et pour deux pH extracellulaires différents concernant plusieurs acides faibles.

Acides faibles	Facteur d'accumulation théorique		pKa
	pH 4	pH 5	
Acide acétique	155	65	4,74
Acide propionique	120	58	4,87
Acide sorbique	149	64	4,76
Acide benzoïque	393	87	4,19

IV.3.4. Validité de notre mesure

La validité de notre calcul repose sur la vérification expérimentale du contenu intracellulaire en acide propionique et sur le calcul du pH_i. Pour cela, ce dernier doit être déplacé hors de la cellule pour être quantifié. Instantanément après avoir été exposées à l'acide propionique, les cellules sont donc resuspendues après centrifugation dans une solution basique afin de favoriser la sortie de l'acide intracellulaire par conséquent de déplacer l'équilibre, le surnageant étant ensuite analysé par CPG. Cette resuspension dans un milieu basique est réalisée deux fois successivement et avec des solutions différentes de KOH (2,5 et 5 N) (Tableau 13).

Tableau 13 : Bilan sur les quantités d'acide propionique introduites dans le milieu, récupérées dans le surnageant et dans les cellules pour deux lavages successifs des cellules dans une solution fortement basique.

Test	Acide ajouté (mg)	Acide surnageant de culture (mg)	KOH (N)	Acide obtenu au 1 ^{er} lavage (mg)	Acide obtenu au 2 ^{ème} lavage (mg)	Récupération (%)
1	6,9	4,2	2,5	1,94	0,169	92
2	14,3	10,9	2,5	3,46	0,040	101
3	6,9	4,72	5	2,61	0	106
4	14	11,1	5	3,90	0	107

Lors de ces différents tests, la quasi-totalité de l'acide intracellulaire est récupérée avec une ou deux étapes de lavage. Le calcul théorique permet donc d'avoir une estimation correcte de la quantité d'acide intracellulaire et par conséquent la disparition rapide d'une fraction de l'acide est bien due à la diffusion passive.

Pour ces différents tests, les calculs du pH_i sont compris entre 6,4 et 6,8 ; ces pH sont proches des données de la littérature, (pH mesurés par des méthodes plus complexes), ce qui valide notre calcul du pH_i .

IV.4. Calcul de la vitesse spécifique de consommation de l'acide

Soit K , la constante de partage de l'acide : $K = \frac{[\Omega]_{in}}{[A]_{exo}}$ avec $[\Omega]_{in}$ en g d'acide.g

de biomasse⁻¹ et $[A]_{exo}$ en g.L⁻¹. Cette constante de partage est supposée invariable tout au long de la période de dégradation ou d'accumulation de l'acide (pH intracellulaire constant et teneur hydrique constante). Cette constante est recalculée pour chaque expérimentation réalisée, en fonction de la quantité d'acide retrouvée dans le surnageant de culture instantanément après l'injection par rapport à la quantité ajoutée.

L'équation bilan sur l'acide introduit dans le milieu s'écrit sous la forme :

$$\text{Le bilan exocellulaire s'écrit sous la forme : } \frac{d(A_{exo} \cdot V_{liquide})}{dt} = \Phi_{liquide-cellule} \quad \text{Equation 41}$$

$$\text{Le bilan sur la cellule s'écrit : } \frac{d(\Omega_{in} \cdot X)}{dt} = q_{acide} \cdot X + \Phi_{cellule-liquide} \quad \text{Equation 42}$$

$$\text{soit : } \frac{d(\Omega_{in} \cdot X)}{dt} = q_{acide} \cdot X - \frac{d(A_{exo} \cdot V_{liquide})}{dt} \quad \text{Equation 43}$$

$$\frac{d(\Omega_{in})}{dt} X + \frac{d(X)}{dt} \Omega_{in} = q_{acide} \cdot X - \frac{d(A_{exo})}{dt} V_{liquide} - \frac{d(V_{liquide})}{dt} A_{exo} \quad \text{Equation 44}$$

$$\text{Si } \frac{d(V_{liquide})}{dt} \text{ est négligé, } \frac{d(\Omega_{in})}{dt} X + \frac{d(X)}{dt} \Omega_{in} = q_{acide} \cdot X - \frac{d(A_{exo})}{dt} V_{liquide} \quad \text{Equation 45}$$

$$\frac{d(\Omega_{in})}{dt} + \frac{d(X)}{dt} \frac{1}{X} \Omega_{in} = q_{acide} - \frac{d(A_{exo})}{dt} \frac{1}{X} V_{liquide} \quad \text{Equation 46}$$

$$\frac{d(\Omega_{in})}{dt} + \mu \Omega_{in} = q_{acide} - \frac{d(A_{exo})}{dt} \frac{1}{X} \text{ avec } X \text{ exprimé en g.L}^{-1}$$

A l'équilibre, $\Omega_{in} = K \cdot A_{exo}$

$$K \frac{d(A_{exo})}{dt} + \mu K A_{in} = q_{acide} - \frac{d(A_{exo})}{dt} \frac{1}{X} \quad \text{Equation 47}$$

Finalement, la vitesse de consommation de l'acide s'exprime par l'équation :

$$q_{acide} = \frac{d(A_{exo})}{dt} \left(K + \frac{1}{X} \right) + \mu K A_{exo} \approx q_{acide} = \frac{d(A_{exo})}{dt} K + \mu K A_{exo} \quad \text{Equation 48}$$

V. Conclusion

Lors de la première culture en limitation de source carbonée, plusieurs carences nutritionnelles en oligo-éléments et en vitamines sont responsables de la bascule du métabolisme oxydatif vers le métabolisme oxydo-réductif, donc vers la production d'éthanol. La caractérisation de ces limitations nutritionnelles nous a permis de redéfinir la solution saline d'alimentation pour obtenir un milieu de croissance non limitant nutritionnellement. L'adéquation du milieu avec les besoins nutritionnels de *S. cerevisiae* nous a permis d'acquérir des données cinétiques et stœchiométriques sur la levure cultivée en mode purement oxydatif et ce jusqu'à des concentrations cellulaires suffisamment élevée afin d'intégrer toutes les dynamiques liées à une production industrielle. Cette première étape permettra par la suite, de nous affranchir de potentielles limitations nutritionnelles liées au milieu de culture afin que les dynamiques observées ne soient représentatives que des stress appliqués.

Dans un deuxième temps, nous avons défini les conditions expérimentales qui nous permettront de visualiser les dynamiques de réponse à un stress acide sans limitation par le transfert d'oxygène et dans des conditions de croissance stabilisées.

Nous avons aussi précisé les conditions expérimentales de traitement de l'échantillonnage assurant la quantification précise des variables abiotiques. Les hypothèses sur la diffusion de la seule forme protonée de l'acide permettent d'estimer les grandeurs biotiques des effecteurs qui seront ultérieurement étudiés par le calcul de facteur d'accumulation, de la concentration en acide intracellulaire et du pH intracellulaire.

CHAPITRE II : Réponse de la levure à l'acide propionique en mode oxydatif

I. Introduction

L'agent conservateur utilisé comme agent de référence dans notre étude est le propionate de potassium (E 283). Il est très utilisé pour la conservation des produits de boulangerie (pains spéciaux, pâtes à gâteau) et laitiers. Son action conservatrice est décrite comme non spécifique et consiste en une inhibition globale du métabolisme ; en particulier pour *Bacillus mesentericus* contaminant fréquent des articles de biscuiterie (Walser et coll., 2001). Ce sel d'acide est reconnu comme GRAS et aucune conséquence néfaste n'a été observée pour la santé des hommes à la suite de l'utilisation d'acide propionique comme additif dans les denrées alimentaires (métabolisme normal des acides gras).

Nous avons dans un premier temps défini les concentrations minimales inhibitrices de l'acide pour notre souche de *S. cerevisiae* en mode respiro-fermentaire. Puis notre étude s'est focalisée sur l'effet de pulses d'acide propionique en cultures discontinues alimentées en mode oxydatif à de fortes concentrations cellulaires. Des facteurs environnementaux différents (pH, concentration en acide et taux de croissance) ont été testés afin de déterminer l'effet réel de l'acide indépendamment de l'environnement. Puis, nous avons comparé les capacités fermentaires et respiratoires en présence ou non d'acide faible selon le vécu de la levure dans le bio-réacteur.

II. Etude préliminaire

Nous avons travaillé avec la forme saline de l'acide et, pour prévenir toute variation de pH suite à l'ajout d'acide dans le réacteur, la solution de sel d'acide injectée est ajustée au pH de travail avec une solution de KOH (10 N).

Dans un premier temps, nous avons défini la concentration minimale inhibitrice affectant temporairement la croissance cellulaire de *S. cerevisiae*. Cette concentration a été déterminée en fioles d'Erlenmeyer en mode respiro-fermentaire. Des concentrations de propionate de potassium ont été testées dans une gamme comprise entre 3,38 mM et 13,5 mM (concentrations finales). La croissance cellulaire n'est pas ralentie suite à un pulse d'acide à une concentration de 3,38 mM ; en revanche, le taux de croissance s'annule pour une concentration de 6,75 mM. Cependant, l'effet d'inhibition de la croissance est vite dissipé puisque la croissance reprend 1 heure après l'ajout d'acide avec un taux de croissance identique à celui obtenu avant le pulse. Pour une concentration proche de 13,5 mM, la croissance est totalement stoppée ; les concentrations ultérieurement utilisées seront par conséquent inférieures à 13,5 mM.

III. Réponse générale de la levure à un pulse d'acide propionique

III.1. Conditions de culture

La culture définie comme la culture de référence est réalisée pour un taux de croissance de la deuxième phase fixé à une valeur de $0,1 \text{ h}^{-1}$ et un pH régulé à une valeur de 5. Alors que la concentration cellulaire est de 40 g.L^{-1} et que le taux de croissance est imposé depuis 4 heures, un premier pulse d'acide propionique est effectué, correspondant à une concentration finale dans le réacteur de $6,75 \text{ mM}$. Un deuxième pulse de concentration identique est effectué 4 heures après le premier pour une concentration en biomasse de 60 g.L^{-1} .

III.2. Variables macroscopiques

Pour chaque pulse d'acide propionique réalisé, la réponse première est une augmentation de la vitesse de consommation d'oxygène (r_{O_2}) et de production de CO_2 (r_{CO_2}) observable dans la minute qui suit l'ajout (Figure 28.B.).

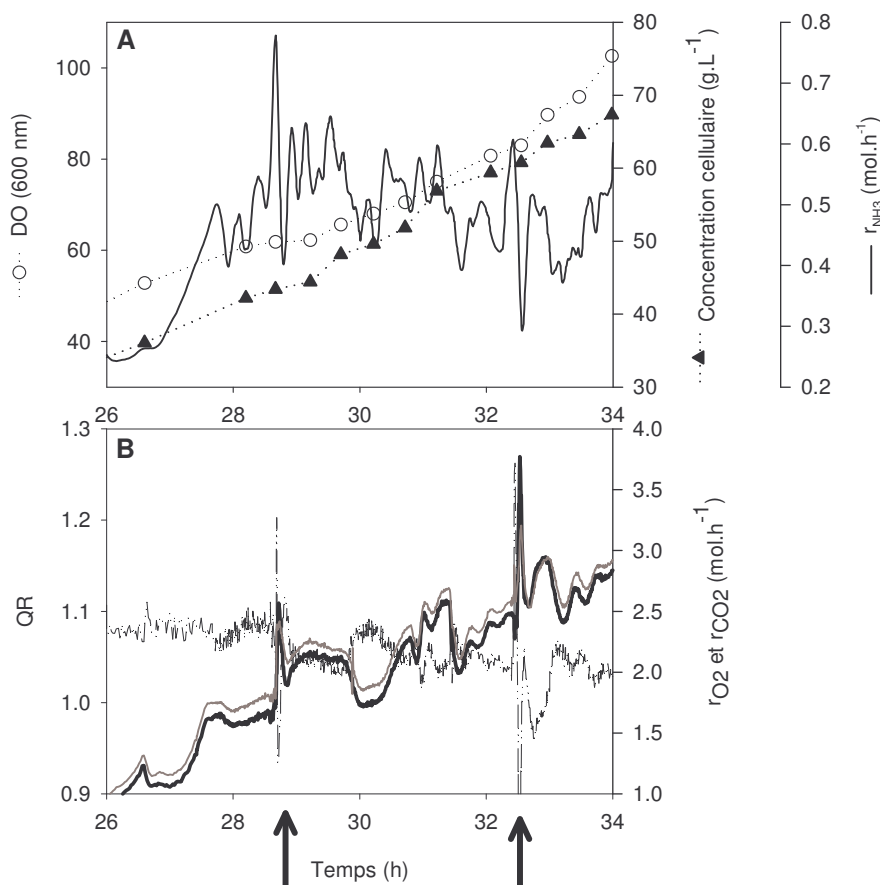


Figure 28 : Evolution des variables macroscopiques pour la culture de référence suite à deux pulses d'acide propionique indiqués par les flèches. A : $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$, concentration cellulaire et r_{NH_3} . B : OR (...), r_{O_2} (—), r_{CO_2} (—).

Le coefficient respiratoire subit des perturbations transitoires, phénomène principalement dû à des modifications physico-chimiques du milieu (modifications salines et probablement de la tension superficielle) pouvant se traduire par une modification des coefficients de transfert d'oxygène et de CO₂.

Suite aux pulses d'acide, en dépit d'une apparente augmentation de la concentration cellulaire, observée par gravimétrie, la mesure turbidimétrique à 600 nm, quant à elle, se stabilise (Figure 28.A.). Cette différence peut s'expliquer par une modification de la morphologie cellulaire comme par exemple une réduction de la taille des levures. Étonnamment, alors que la solution d'acide injectée est neutralisée au pH de travail, nous observons une accélération du flux d'apport d'ammoniacque au moment de l'ajout, puis une diminution très rapide (Figure 28. A.)

Le dosage du glucose montre que la concentration résiduelle n'évolue pas suite aux pulses et est toujours de 40 mg.L⁻¹. La totalité du glucose envoyé dans le réacteur est donc consommée. Contrairement aux observations faites lors de cultures discontinues réalisées en mode oxydo-réductif, il n'y a pas d'inhibition des transporteurs du glucose ou de la glycolyse (Rossel et coll., 2002 ; François et coll., 1986). Le métabolisme reste en mode oxydatif comme en atteste l'évolution du QR et l'absence de métabolites caractéristiques du catabolisme fermentaire du glucose (Figure 28.B.). Il existe donc une redistribution des flux de carbone vers la voie oxydative de dégradation.

Les bilans carbone et redox permettent de valider la description quantitative de la réponse biologique et de mettre éventuellement en évidence la présence de composés non mesurés. L'approche des quantités cumulées est utilisée pour calculer les bilans. Les quantités de matière sont exprimées en Cmol.

Concernant la réponse à un pulse d'acide (de la phase a à la phase d, phases qui seront discutées ultérieurement), la description de la réponse biologique par la mesure du glucose, de la biomasse, de l'oxygène, du CO₂ et de l'acide propionique permet de retrouver 99 % du carbone apporté par l'alimentation et le pulse d'acide et 97 % des électrons (e⁻) disponibles. Les principaux acteurs de la réponse biologique ont donc été pris en compte (Tableau 14).

Tableau 14 : Bilans carbone et redox pendant la période d'un premier pulse d'acide propionique pour un taux de croissance de 0,1 h⁻¹ et un pH de 5. La masse de la Cmol de la biomasse est de 24,92 (hors cendres). Le degré de réduction est de +4,01 pour la biomasse, +4 pour le glucose, +4,67 pour l'acide propionique, -4 pour l'oxygène et de 0 pour le CO₂.

Composé	Carbone (Cmoles)	e ⁻ disponibles (moles)
Glucose	-10,79	-43,2
Acide propionique	-0,23	-1,1
O ₂	0	19,4
Biomasse	5,82	23,3
CO ₂	5,15	0
Bilan	99 %	97 %

La confirmation des bilans redox et carbone bouclés et la non détection de co-produits nous permettent d'interpréter le pulse d'acide par une analyse cinétique basée sur les vitesses spécifiques. Pour cela, il faut estimer l'évolution de la biomasse tout au long de la durée du pulse. Sur la base du rendement carbone en biomasse obtenu pour le régime stabilisé avant le pulse, R_{SX} , la vitesse de croissance instantanée peut être estimée à partir du flux de carbone entièrement consommé et de la production de dioxyde de carbone : $r_X \cdot V = \Phi_{glucose} \cdot R_{S,X}$. Par intégration numérique, la concentration en

biomasse en fonction du temps s'écrit alors : $X_t = MM_X \int_{tpulse}^t \frac{\Phi_{glucose} \cdot R_{S,X}}{V(t)} \cdot dt$ où MM_X

est la masse molaire de la Cmole de biomasse. La concentration en biomasse ainsi estimée est en parfaite adéquation avec les mesures discrètes obtenues expérimentalement. Sur la base du rendement carbone en biomasse obtenu pour le régime stabilisé d'avant pulse (R_{SX}) et du rendement relatif à l'oxygène R_{SO_2} , le flux et la vitesse instantanée de consommation d'oxygène théorique correspondant à la seule réaction de croissance peuvent être estimés :

$\Phi_{O_2}^{théorique} = r_{O_2}^{théorique} \cdot V = r_X \cdot V \cdot \frac{R_{SO_2}}{R_{SX}} = (\Phi_{glucose} - \Phi_{CO_2}) \cdot \frac{R_{SO_2}}{R_{SX}}$. Il est alors possible de calculer

les vitesses spécifiques de consommation et de production, et la vitesse spécifique de consommation d'oxygène s'écrit :

$$q_{O_2}^{théorique} = \frac{r_{O_2}^{thé} \cdot V}{X \cdot V} = \frac{(\Phi_{glucose} - \Phi_{CO_2}) \cdot \frac{R_{SO_2}}{R_{SX}}}{V_{(t)} \cdot MM_X \int_{tpulse}^t \frac{(\Phi_{glucose} - \Phi_{CO_2})}{V_{(t)}} \cdot dt} \quad \text{Equation 49}$$

Le pulse d'acide propionique est visible sur l'évolution de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène (Figure 29.A.). Le retour à la valeur initiale se fait en 2 h et 1 h respectivement pour le premier et le second pulse. La vitesse spécifique augmente de 2,4 à 3,6 et de 2,5 à 3,9 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ respectivement pour le premier et le second pulse.

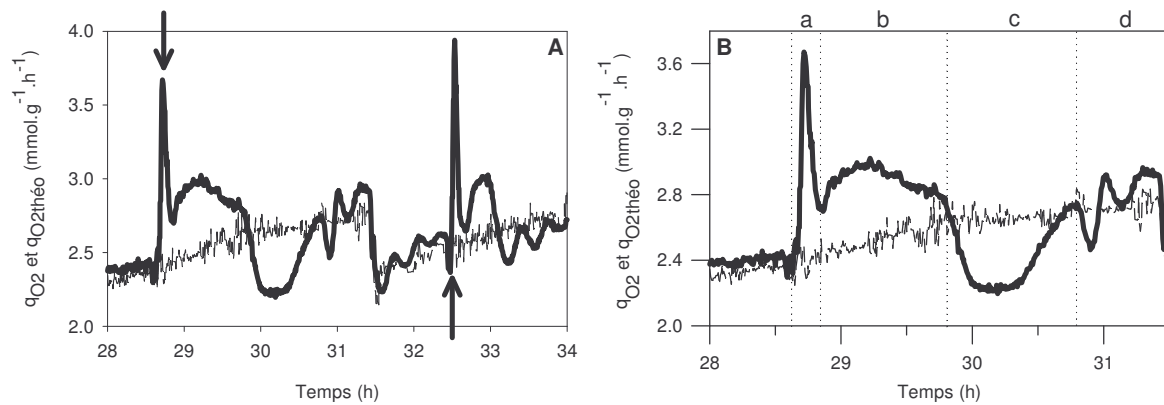


Figure 29 : Evolution des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène théorique (---) et réelle (—). A : Suite à deux pulses d'acide propionique indiqués par des flèches. B : Suite au premier pulse d'acide, vitesse de respiration divisée en 4 phases distinctes.

La réponse temporaire peut être analysée après les pulses acides en comparant les évolutions des vitesses spécifiques obtenues par rapport aux vitesses spécifiques théoriques, notamment celle de la consommation d'oxygène.

D'après la figure 29.B., la réponse à l'acide peut être analysée en quatre phases distinctes. Dès que l'acide est injecté dans le réacteur, la q_{O_2} augmente très rapidement pour atteindre la valeur de 3,6 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ (1,5 fois $q_{O_2théo}$, phase a). Cette première réponse à l'acide est instantanée suite au pulse et brève (15 minutes). Ensuite, la vitesse spécifique diminue à une valeur légèrement supérieure à la valeur théorique (1,2 fois $q_{O_2théo}$) maintenue à cette valeur pendant une heure (phase b). Ensuite, la vitesse devient inférieure à la valeur théorique d'un facteur 1,15 pendant quarante-cinq minutes (phase c). La dernière phase (phase d) correspond à un retour à la valeur théorique.

Un deuxième pulse de concentration identique est réalisé dans le but de connaître la réponse pour des cellules qui ont déjà été exposées à l'acide. Quand les variables macroscopiques sont stabilisées, pour des conditions opératoires empêchant une

potentielle limitation par l'oxygène c'est-à-dire 4 heures après le premier pulse, un second ajout est réalisé pour une concentration cellulaire de 60 g.L^{-1} . Les observations macroscopiques sont identiques pour q_{O_2} , q_{CO_2} , DO_{600nm} et pour la régulation pH (Figure 29.A.). Une différence significative peut être observée sur les durées des phases b et c qui sont plus courtes (respectivement 30 et 20 min), cette différence peut être corrélée à l'augmentation de la dynamique due à un accroissement de la concentration cellulaire (de 40 à 60 g.L^{-1}).

III.3. Dégradation de l'acide propionique

Les acides faibles sont connus pour entrer dans la cellule par diffusion passive et l'acide propionique est incorporé dès son injection dans le milieu de culture. Dix temps de mélange après l'injection, soit 5 secondes, 34 % et 44 % de l'acide introduit dans le réacteur sont retrouvés dans le surnageant respectivement pour le premier et le second pulse. Cette concentration diminue progressivement pour totalement disparaître en 1 heure et en 30 minutes après les injections respectivement pour le premier et le second pulse (Figure 30). La fin de la phase b de la respiration correspond à l'épuisement de l'acide propionique. D'après les calculs définis dans le paragraphe IV.3.3. (cf. Chapitre I, Résultats), la vitesse spécifique maximale de dégradation de l'acide est de $0,24 \text{ mmol.g de biomasse}^{-1}.\text{h}^{-1}$, durant la phase a et les vitesses moyennes calculées sur les phases a et b pour le premier et le second pulse sont respectivement de 0,11 et 0,15 $\text{mmol.g de biomasse}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

III.4. Cations intracellulaires

Les contenus intracellulaires initiaux en potassium et magnésium sont respectivement de 280 mM et 48 mM, ce qui correspond pour le potassium aux données de la littérature avec une concentration intracellulaire pour *S. cerevisiae* comprise entre 200 et 300 mM (Rodriguez-Navarro, 2000).

Après l'injection d'acide, l'analyse des cations montre une entrée massive de potassium et de magnésium (Figure 30).

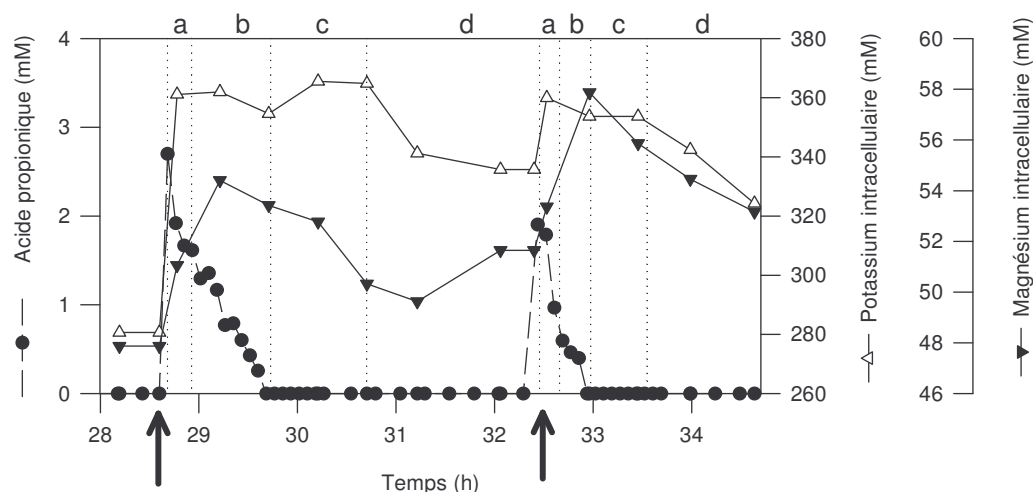


Figure 30 : Evolution des concentrations en acide propionique exocellulaire, en potassium et en magnésium intracellulaires suite aux deux pulses d'acide propionique indiqués par les flèches pour la culture de référence.

Pendant la phase a, la concentration intracellulaire en potassium augmente pour atteindre une valeur 1,3 fois supérieure à sa valeur initiale (370 mM) et se stabilise à cette valeur durant les phases b et c de la respiration. La décroissance de la teneur intracellulaire durant la phase d est insuffisante pour un retour à la valeur initiale et reste à une valeur 1,2 fois supérieure. Après le second pulse, la concentration intracellulaire atteint la même valeur que celle obtenue après le premier pulse et suit la même dynamique que celle précédemment décrite.

Concernant le magnésium, pendant les phases a et b, la concentration intracellulaire augmente pour atteindre sa valeur maximale qui est 1,15 fois supérieure à la valeur initiale. Ensuite, la concentration diminue progressivement pour atteindre une valeur proche de la concentration initiale. Après le second pulse, le contenu intracellulaire augmente pour atteindre une valeur 1,2 fois supérieure à la valeur initiale 30 minutes après le pulse. Et comme pour le premier pulse, la concentration intracellulaire diminue progressivement pendant 2 heures.

La concentration intracellulaire en sodium diminue pendant toute la culture et ne montre pas de variation significative après les deux pulses.

Durant la phase a, l'augmentation du flux d'apport de liquide correcteur de pH (ammoniaque) peut être corrélée à cette accumulation intracellulaire de cations correspondant à une incorporation d'une base forte (K^+), l'acidification correspondante étant compensée par une base faible. Cette acidification est incrémentée par la surproduction de CO_2 (acide faible) induisant une sursaturation transitoire comme en témoigne une baisse momentanée du coefficient respiratoire au cours de cette phase.

III.5. Dégradation des sucres de réserves

Pendant la phase de croissance exponentielle, les contenus intracellulaires en glycogène et tréhalose sont respectivement de 4 et 5 % (Figure 31).

5 minutes après le pulse d'acide, une dégradation des sucres de réserves est observée et les teneurs en carbohydrates atteignent des valeurs de 3,7 et 4 % respectivement pour le glycogène et le tréhalose. Cette consommation de sucres de réserves perdure pendant la phase b pour atteindre des valeurs finales de 2,5 % pour les deux types de réserves. Pour le premier pulse, le tréhalose est préférentiellement dégradé. Pendant les phases c et d, une accumulation des réserves démarre pour s'arrêter à des teneurs intracellulaires en sucres proches de celles précédant le pulse. Pour le second pulse, cette mobilisation globale des réserves est moins prononcée, néanmoins, des phases identiques sont observées et le glycogène est préférentiellement dégradé.

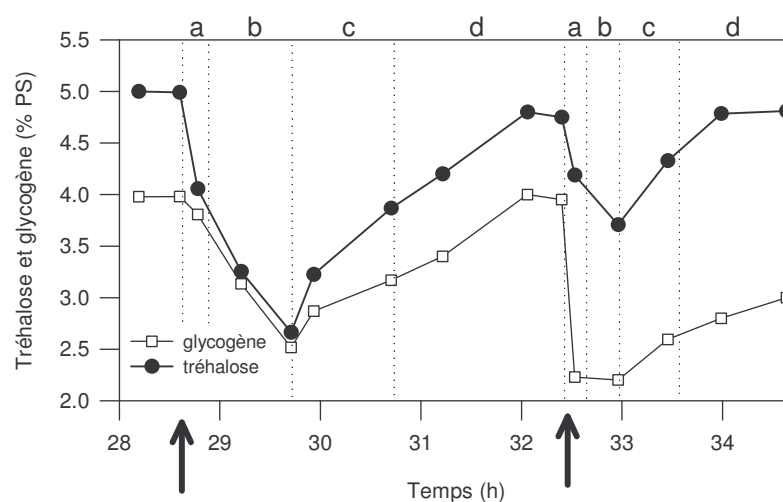


Figure 31 : Evolution des teneurs intracellulaires en tréhalose et glycogène suite aux deux pulses d'acide propionique indiqués par des flèches.

III.6. Métabolites intracellulaires

Cette analyse s'est focalisée sur les intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs dont les concentrations sont exprimées par la valeur normée par la concentration d'avant pulse et ce pour chaque pulse et selon les différentes phases de la respiration (Tableau 15). Instantanément après le premier pulse d'acide, les concentrations intracellulaires de tréhalose-6-P (T-6-P), de glucose-6-P (G-6-P) et de fructose-6-P (F-6-P) diminuent. Cette diminution des teneurs en sucres phosphorylés est moins importante pour le second pulse. Le fructose-1,6-P₂ (F-1,6-P₂) est le seul sucre phosphorylé dont la

concentration augmente transitoirement sur une période de 5 minutes suite à l'ajout d'acide propionique. Pendant cette même durée, la concentration en phosphoénolpyruvate (PEP) diminue de manière drastique d'un facteur 3, l'accumulation d'acide pyruvique (1,5 fois) bien que moins importante doit être considérée comme significative. Concernant les métabolites du cycle de Krebs, nous n'observons aucun changement pour les acides α -cétoglutarique, isocitrique et succinique alors que trois composés voient leurs concentrations intracellulaires augmenter (acides fumarique, citrique et malique). Pour tous les composés, les concentrations intracellulaires retournent à leurs valeurs précédant le pulse pendant la phase d de respiration, excepté pour le F-1,6-P₂ dont la concentration reste à une valeur 1,3 fois supérieure à la valeur de référence. Généralement, le comportement dynamique pendant le second pulse est similaire avec cependant une amplitude légèrement inférieure excepté pour le F-1,6-P₂, et les acides fumarique et malique.

Tableau 15 : Récapitulatif des évolutions des métabolites intracellulaires suite aux deux pulses d'acide propionique pour les différentes phases de respiration.

Métabolites	pulse	Phases de respiration				
		0	a	b	c	d
Tréhalose-6-P	1 ^{er}	1	0,3	0,44	1,7	1
	S nd	1	1	0,94	0,82	1
Glucose-6-P	1 ^{er}	1	0,51	0,33	0,42	0,95
	S nd	1	1	0,5	0,4	1
Fructose-6-P	1 ^{er}	1	0,14	0,56	0,99	0,93
	S nd	1	0,5	0,5	0,8	1
Fructose-1,6-P ₂	1 ^{er}	1	1,4	1,3	1,44	1,32
	S nd	1	2,2	1,2	1	1
PEP	1 ^{er}	1	0,6	0,7	0,97	0,9
	S nd	1	0,3	0,8	1	1,12
acide pyruvique	1 ^{er}	1	1,03	1,42	0,8	0,92
	S nd	1	1,01	1,3	1,1	1,1
acide fumarique	1 ^{er}	1	1,6	1,8	1,1	1,1
	S nd	1	3	1,8	1,4	1
acide citrique	1 ^{er}	1	3	4,5	0,4	0,95
	S nd	1	2,4	2	1,8	1
acide malique	1 ^{er}	1	1,4	1,8	0,9	1,12
	S nd	1	2,55	1,1	1	1,05

III.7. Bilans carbone et redox au cours de la réponse à un pulse acide

L'observation d'une dégradation des sucres de réserves est indicative d'une variation importante de la composition macromoléculaire de la biomasse et représente une source de carbone additionnelle temporaire. Afin d'affiner les résultats obtenus sur la réponse globale à un pulse d'acide propionique, nous avons analysé la dynamique des

bilans carbone et redox en fonction des différentes phases de la respiration (Tableau 16). Pendant la phase a, les bilans carbone et redox présentent respectivement un déficit de 15 et 18 %. Pendant la phase b de la respiration les bilans bouclent parfaitement. Au cours de la phase c de la respiration, les bilans sont excédentaires. Or pendant la phase a, le déficit en carbone est de 0,33 Cmoles et pendant la phase c, l'excédent est de 0,35 Cmoles, ce qui explique pourquoi globalement sur la durée du pulse, les bilans bouclent. Puisque aucun co-produit n'est détecté par CPG ou par HPLC, et puisque l'intégralité du glucose envoyé dans le réacteur est consommée, ceci semble indiquer que ce phénomène a lieu au niveau de la biomasse.

Tableau 16 : Bilan carbone et redox les différentes phases qui suivent un premier pulse d'acide propionique pour un taux de croissance de $0,1 \text{ h}^{-1}$ et un pH de 5. La masse de la Cmol de la biomasse est de 24,92 g (hors cendres). Le degré de réduction est de +4,01 pour la biomasse, +4 pour le glucose, +4,67 pour l'acide propionique, -4 pour l'oxygène et de 0 pour le CO_2 .

Composé	Phase a		Phase b		Phase c	
	Carbone (Cmoles)	e^- disponibles (moles)	Carbone (Cmoles)	e^- disponibles (moles)	Carbone (Cmoles)	e^- disponibles (moles)
Glucose	-2,21	-8,82	-5,34	-21,37	-3,25	-12,98
Acide propionique	0	0	-0,23	-1,09	0	0
O_2	0	4,1	0	10,27	0	5,07
Biomasse	0,78	3,14	3,32	13,31	1,71	6,87
CO_2	1,09	0	2,70	0	1,35	0
Réserves	0	0	-0,52	-2,07	0,54	2,12
Bilan	85 %	82 %	99 %	96 %	111 %	108 %

Ainsi, le stress acide pourrait provoquer un changement de la composition de la biomasse comme le montrent la dégradation des sucres de réserve et l'importance des échanges ioniques. Toutefois, cette modification de biomasse n'est pas à même d'expliquer les écarts calculés pour les différents bilans. Comme décrit dans la partie bibliographie, la diffusion d'un acide faible engendre des flux salins importants mais également perturbe les flux de dioxyde de carbone. Dans la phase a, correspondant à une forte surproduction de CO_2 simultanée à une accumulation de sels, il n'est pas exclu qu'une accumulation intracellulaire de carbonates puisse se produire participant ainsi au déficit en carbone calculé. Cette hypothèse est étayée par les analyses élémentaires de la composition de la biomasse donnant une formule brute de $\text{CH}_{1,34}\text{O}_{0,62}\text{N}_{0,19}$. Cette composition correspond à un degré de réduction nettement plus faible que celui déterminé en métabolisme balancé (respectivement de 3,54 et 4,01) et l'accroissement du rapport O/C de 0,54 à 0,62 correspondraient bien à un piégeage du CO_2 sous forme de carbonates durant cette phase. En effet, pour avoir un degré de réduction aussi faible,

il se pourrait que le CO_2 soit accumulé sous forme de carbonates à l'intérieur de la cellule. Lors de l'analyse, il est comptabilisé dans la formule élémentaire. Or ce composé avec un degré de réduction de zéro fait chuter le degré de réduction de la biomasse. Les simulations de composition de la biomasse montrent qu'une proportion de 15 % de la masse totale en CO_2 ramène le degré de réduction de la biomasse à une valeur de 3,6.

Les observations décrites ci-dessus sont en partie cohérentes avec celles de la littérature mais la mise en œuvre du mode de culture fed-bach a révélé une séquence événementielle nouvelle. Avant d'interpréter les différentes phases d'après les hypothèses énergétiques émises par différents auteurs, il convient de vérifier si le comportement observé est spécifique de l'effet inducteur, indépendamment des conditions environnementales et de l'état physiologique de la levure.

III.8. Comparaison pour différentes conditions de culture

III.8.1. Cultures réalisées

Dans le but d'étudier l'effet de l'état métabolique de la souche et l'impact supposé de la forme non dissociée de l'acide, des cultures ont été réalisées avec un ou plusieurs paramètres qui diffèrent de la culture de référence : un ajout à une concentration plus faible d'acide (3,38 mM), un taux de croissance plus faible ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$) et un pH différent (pH 4) (Tableau 17). Pour un pH de culture de 5, le volume cytosolique est toujours identique, voisin de $1,5 \text{ mL.g}$ de biomasse⁻¹. En revanche, pour un pH de 4, le volume cytosolique est réduit à une valeur de 1 mL.g de biomasse⁻¹. Ce volume cytosolique reste identique avant et après les pulses d'acide. Ces résultats sont en accord avec Henriques et coll. (1997) qui mesurent le volume cytosolique avant et après l'addition d'acide benzoïque dans le milieu de culture par plusieurs méthodes et qui n'observent aucun effet de l'acide sur la valeur du volume cytosolique.

Tableau 17 : Conditions de cultures : pH, taux de croissance et concentrations d'acide injectées pour les deux pulses successifs.

pH	Taux de croissance (h^{-1})	[A] _{injectée} 1 ^{er} pulse (mM)	[A] _{injectée} S nd pulse (mM)
5	0,1	6,75	6,75
5	0,1	3,38	6,75
5	0,05	6,75	6,75
4	0,1	3,38	6,75

Dans le but de vérifier l'hypothèse d'une réponse métabolique corrélée à une diffusion instantanée de la forme non dissociée, pour une culture à pH 4, la concentration du premier pulse d'acide a été calculée dans le but d'atteindre une concentration intracellulaire en forme non dissociée identique à celle obtenue pour la culture de référence. Cette estimation est établie à partir de l'équation de Hendersen-Hasselbach (cf. Equations 36 et 37, § IV.3.3., Chapitre I, Résultats). Cette même concentration exocellulaire a aussi été injectée à pH 5. Pour le second pulse à pH 4, une concentration totale identique à celle utilisée pour la culture de référence a été injectée (6,75 mM).

Pour la culture à pH 5 et $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ avec la même concentration en acide injectée, l'objectif est de quantifier la demande énergétique ou de montrer une limitation énergétique hypothétique due à la diffusion de l'acide. La diminution du taux de croissance est suffisante pour initialiser la vitesse spécifique de consommation d'oxygène à un niveau 2 fois plus faible que la valeur de la culture de référence. Ainsi l'amplitude de la réponse renseignera sur une éventuelle corrélation avec un état physiologique contrôlé par le taux de croissance.

III.8.2. Résultats

En ce qui concerne les variables macroscopiques, les observations suite au pulse d'acide sont identiques pour les différentes cultures réalisées (r_{O_2} , r_{CO_2} , r_{NH_3} , $DO_{600 \text{ nm}}$). Les vitesses spécifiques de respiration montrent des variations similaires et nous observons les mêmes phases décrites suite à un pulse d'acide pour la culture référence (Figure 32.B.). Pour la culture à pH 4 (Figure 32.A.), la phase b est plus courte que pour la culture de référence ou pour celle à pH 5, cette différence s'explique par le fait que la quantité d'acide injectée est inférieure et par conséquent, la phase de dégradation plus rapide. Pour la culture à un taux de croissance plus faible (Figure 32.B.), la respiration lors de la phase b a une allure légèrement différente avec le plateau de respiration qui reste à une valeur très élevée (2,8 fois supérieure à la valeur de la $q_{O_2 \text{ théorique}}$). Les sucres de réserves étant connus pour s'accumuler à des teneurs plus élevées pour des taux de croissance plus faibles, la dégradation de ces sucres peut expliquer cette plus forte amplitude de respiration pour un taux de croissance de $0,05 \text{ h}^{-1}$.

L'amplitude de la variation de la q_{O_2} est pour la culture de référence de $+1,2 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (phase a) et de $+0,6 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (phase b). Pour un taux de croissance de $0,05 \text{ h}^{-1}$, l'amplitude de la variation est de $+1,5 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (phase a) et $+1,2 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (phase b). Ces amplitudes ne sont pas proportionnelles à la respiration basale imposée par la limitation carbonée et la réponse peut être interprétée par rapport à l'amplitude des effets induits par l'addition d'acide dans le réacteur.

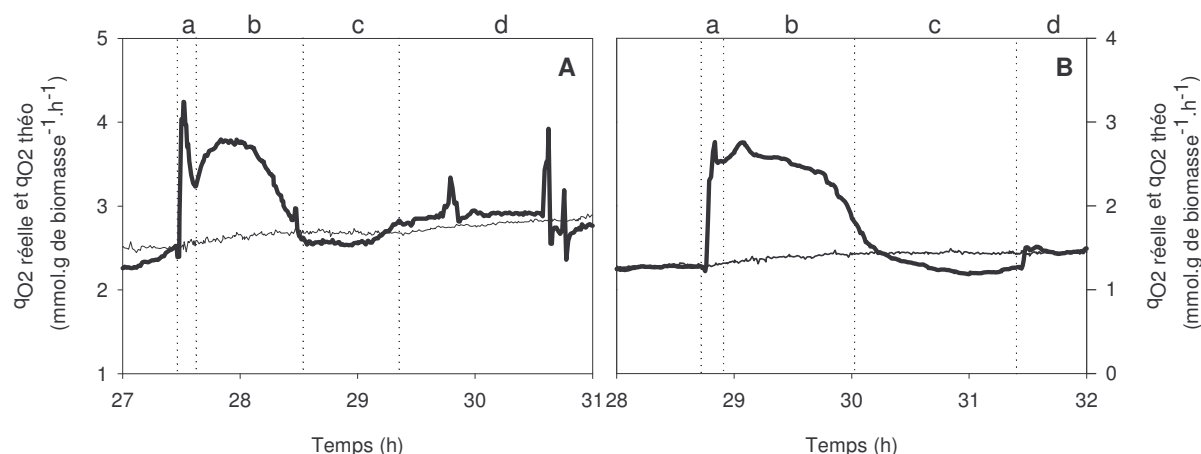


Figure 32 : Vitesses spécifiques de respiration réelles (—) et théoriques (---) suite à un premier pulse d'acide pour différentes conditions de culture. A : pH 4, $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ et B : pH 5 et $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$.

Par ailleurs, pour toutes les conditions testées, nous observons une dégradation des sucres de réserves intracellulaires pendant la phase b puis une reconstruction pendant la phase c.

Les résultats obtenus pour ces différentes expérimentations concernant la concentration en acide intracellulaire, le pH_i , et le facteur d'accumulation sont répertoriés dans le tableau 18. Pour toutes les expérimentations réalisées, le facteur d'accumulation est légèrement inférieur au facteur d'accumulation théorique (cf. § IV3.3., Chapitre I, Résultats).

En dépit d'une concentration intracellulaire multipliée par 2 à pH 4, la levure régule instantanément son pH_i , indépendamment de la concentration en acide intracellulaire. Dans toutes les conditions testées, le pH_i est dans une gamme comprise entre 6,5 et 6,9. Par conséquent, indépendamment des concentrations intracellulaires d'acide, la levure active un mécanisme lui permettant de réguler son pH_i à des valeurs proches des valeurs physiologiquement optimales comprises entre 6,8 et 7,2 (Navon et coll., 1979 ; Nicolay et coll., 1982 ; Warth 1988).

La concentration intracellulaire totale obtenue à pH 4 (85 mM) est suffisamment proche du calcul prévisionnel (78 et 85 mM) pour confirmer l'hypothèse de l'entrée de l'acide par diffusion simple de la forme protonée gouvernée par le gradient de pH.

Dans toutes les cultures réalisées, le pH intracellulaire calculé est légèrement inférieur lors du second pulse, ce qui montre que la cellule ne possède aucun acquis vis à vis de sa potentialité de régulation du pH_i malgré une première exposition à l'acide.

Pour chaque culture, nous avons calculé pour la phase a, le $Y_{\text{Acide,ATP}}^*$ qui correspond au nombre de moles d'ATP consommées par mole d'acide intracellulaire. Le nombre de moles d'ATP est calculé à partir du surplus de moles d'oxygène consommées par rapport à une consommation en métabolisme balancé, en se basant sur un rapport

P/O de 1,33 et sur l'énergie par la phosphorylation liée au substrat générée par le catabolisme du glucose (PLS).

Tableau 18 : Concentrations en acide propionique intracellulaire, facteurs d'accumulation, pH_i , $Y_{Acide,ATP}^*$ et vitesses spécifiques de consommation d'acide propionique selon les différentes conditions réalisées, suite aux pulses d'acide propionique.

Conditions		A_{in} (mM)	F	pH_i	$Y_{Acide,ATP}^*$	$q_{acide\ propionique}$
$\mu = 0,1\ h^{-1}$	1 ^{er}	78	40	6,9	4,2	0,116
pH 5	Snd	65	34	6,8	3,6	0,147
$\mu = 0,1\ h^{-1}$	1 ^{er}	38	33	6,7	7,8	0,132
pH 5	Snd	69	34	6,8	8,4	0,160
$\mu = 0,05\ h^{-1}$	1 ^{er}	65	28	6,7	6,2	0,113
pH 5	Snd	43	13	6,5	6,2	0,129
$\mu = 0,1\ h^{-1}$	1 ^{er}	85	115	6,9	3,5	0,109
pH 4	Snd	121	68	6,7	2,5	0,119

$q_{acide\ propionique}$ en mmoles.g de biomasse⁻¹. h⁻¹

$Y_{Acide,ATP}^*$ en moles d'ATP consommées.mole d'acide intracellulaire⁻¹

L'acide propionique est dégradé comme décrit par Pronk et coll. (1994) et la vitesse spécifique moyenne de dégradation de l'acide est de $0,1175 \pm 0,01$ mmoles.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ pour le premier pulse et est supérieure de 18 % au second pulse ($0,139 \pm 0,01$ mmoles.g de biomasse⁻¹.h⁻¹). Pour les différentes conditions réalisées, l'homogénéité de la vitesse de dégradation indique que ni le pH de travail, ni l'état physiologique ne sont de nature à influencer sur cette capacité de dégradation. La simultanéité entre l'ajout d'acide et la consommation plaide pour la présence d'une voie catabolique constitutive dont l'activité ne semble pas réprimée par un flux glycolytique.

III.9. Discussion

Les levures ont à faire face à une intrusion d'acide et pour cela, des mécanismes interconnectés temporellement prennent place pendant deux heures avant un retour à un état physiologique « normal ». La dynamique de respiration après un pulse d'acide propionique permet de prendre en compte plusieurs phénomènes qui définissent la réponse physiologique globale de la levure.

III.9.1. Dissipation instantanée d'énergie et entrée de cations

Instantanément après le pulse d'acide, la première phase (phase a) correspond à une augmentation de la vitesse de respiration 1,5 fois supérieure à la valeur théorique et ne dure que 15 minutes. Cependant, cette augmentation de la respiration pour des

cultures de type fed-batch est inférieure à celle obtenue pour des cultures continues. En effet, Verduyn et coll. (1992) observent des respirations multipliées par 9 en présence d'acide benzoïque dans le milieu d'alimentation. Généralement, cette observation est expliquée par la diffusion passive de la forme non dissociée de l'acide induisant une acidification du cytosol avec une augmentation de l'activité de l' H^+ -ATPase de la membrane plasmique pour l'exportation de protons et avec une dissipation de la force proton motrice par un effet découplant avec une diminution du ratio $\frac{P}{O}$ (Postma et coll., 1989 ; Verduyn et coll., 1992). Quelles que soient les conditions de culture, la partition mesurée de l'acide propionique permet d'estimer un pH_i proche des valeurs de pH_i décrites dans la littérature (6,8-7,2 ; Navon et coll., 1979 ; Nicolay et coll., 1982).

Dans notre cas, cette régulation du pH_i infirme l'hypothèse d'un découplage énergétique au niveau de la chaîne respiratoire altérant le rendement de la phosphorylation oxydative. Le maintien d'un pH proche de sa valeur physiologiquement optimale implique qu'il n'y a ni acidification de la mitochondrie (dissipation du gradient de protons), ni acidification du cytosol (c'est à dire accroissement du gradient de protons transmembranaire mitochondrial qui limiterait l'exportation extramitochondriale des protons liée au fonctionnement de la chaîne respiratoire).

Nous aurions pu aussi penser à une augmentation de respiration liée à l'entrée de K^+ dans la cellule, les ions potassium étant transportés activement par un système antiport K^+/H^+ (Sychrova, 2004). Cette entrée de potassium est déjà reportée dans la littérature suite à des pulses d'acide propionique ou acétique (Ryan, 1971, Conway et coll., 1950, Macpherson et coll., 2005). Dans nos expérimentations, la quantité de potassium incorporée est en adéquation avec la neutralisation de l'acide intracellulaire (Figure 30) et la quantité correspondante de protons exportés ne représenterait que 10 % de la quantité totale de protons potentiellement générés par l'excès de respiration.

Comme reporté dans le tableau 18, la quantité estimée d'ATP dissipée par mole d'acide est très largement supérieure à 1, ce qui laisse supposer l'existence d'un véritable cycle futile de dissipation de l'énergie liée à la dynamique d'entrée de l'acide. Donc, ce surplus de respiration peut être imputé majoritairement à une dépense énergétique pour maintenir le pH_i probablement réalisé par l' H^+ -ATPase membranaire.

La fin de la dissipation d'énergie (fin de la phase a) correspondrait à la neutralisation de l'acide propionique par une base (K^+) et, l'intensité de dissipation durant cette phase dépendrait de la capacité cellulaire à transporter le contre-ion.

Verduyn et coll. (1992) observent qu'un pulse d'acide benzoïque dans des cultures continues induit un « shift » métabolique vers la production d'éthanol. Pour des cultures réalisées en métabolisme oxydo-réductif, un pulse d'acide benzoïque induit une réduction de la vitesse d'assimilation du glucose et une accumulation des métabolites de la

glycolyse avant la phosphofructokinase 1 (Krebs et coll., 1983 ; François et coll., 1986). Dans nos conditions de culture, en dépit d'une augmentation du ratio pyruvate/PEP, nous n'observons aucune production d'éthanol et aucune accumulation des intermédiaires glycolytiques ce qui est en accord avec les résultats de Warth (1991). En revanche, les niveaux élevés des acides carboxyliques du cycle de Krebs concordent avec une accélération du catabolisme énergétique oxydatif requise pour une homéostasie du pH_i à une valeur en adéquation avec une activité cellulaire optimale.

III.9.2. Consommation des sucres de réserves : rôle de la pression osmotique intracellulaire ?

Pendant la phase b de la respiration, la vitesse spécifique de consommation d'oxygène reste élevée par rapport à la valeur théorique et l'acide propionique est consommé à une vitesse qui semble indépendante des conditions de culture. Durant cette phase, les réserves sont dégradées, ce qui est en accord avec les observations de Guillou (1996) et Poilpré (2002). L'excès de respiration (0,27 moles d'O₂ pour la culture de référence) peut être expliqué par une oxydation partielle du flux de carbone supplémentaire résultant de la dégradation des réserves intracellulaires (0,52 Cmoles) et de l'acide propionique (0,214 Cmoles) et représenterait un rendement de 0,36 moles d'O₂.Cmoles⁻¹. Les observations obtenues sur les niveaux intracellulaires de tréhalose-6-P, pyruvate, citrate, malate semblent confirmer l'existence de ces flux supplémentaires.

Suite à l'hypothèse de neutralisation de l'acide par une entrée de potassium argumentée ci-dessus, l'induction du catabolisme des réserves ne peut pas se justifier par une demande accrue d'oxydation de carbone pour faire face à une dissipation d'énergie suite à l'acidification du cytosol. Pour contrer un stress hyper ou hypo-osmotique, la levure fait intervenir des osmolytes tels que les polyols, le glycérol et le tréhalose qui par une extrusion ou accumulation active maintiennent l'homéostasie de la pression de turgescence en modifiant la pression osmotique intracellulaire. Larsson et coll. (1990) estiment que la pression de turgescence de la levure *Debaryomyces* peut varier entre 2200 et 500 kPa pour un milieu minéral supplémenté avec respectivement 4 mM et 1,35 M de NaCl. Dans notre cas, en utilisant la loi de Van't Hoff ($\pi = n.R.T.C$ avec R constante des gaz parfaits, T température absolue et n.C la quantité d'osmolytes participant à la pression de turgescence), la seule contribution de l'acide propionique et des ions potassium à la pression de turgescence peut être évaluée à 400 kPa. Bien que ces calculs soient à corriger par un coefficient d'activité osmotique, l'amplitude de cette augmentation peut expliquer la dégradation de composés solubles qui prennent part dans l'homéostasie de la pression de turgescence tels que le tréhalose.

Malgré la consommation de l'acide propionique, qui selon l'hypothèse d'un facteur de concentration constant, suppose une diminution de la concentration intracellulaire de

la forme dissociée, la teneur en potassium intracellulaire reste constante. Ceci suppose une alcalinisation progressive du cytosol avec un excès de potassium pérennisant la pression de turgescence.

De plus, comme reporté pour *Escherichia coli* (Conska 1989), une des réponses à une augmentation de pression osmotique consiste en une perte hydrique qui, par la réduction de l'activité osmotique des solutés aqueux, permet un contrôle de la pression de turgescence par la concentration des solutés. Cette réponse pourrait être à l'origine d'une réduction du volume cellulaire, ce qui expliquerait dans nos conditions, la stagnation de la $DO_{600\text{ nm}}$ en dépit d'une augmentation de la concentration en masse sèche.

Une autre hypothèse trouverait ses arguments dans la modification transitoire du pH_i . En effet, même si toutes les observations plaident en faveur d'une régulation, les valeurs estimées, sont légèrement inférieures au pH nominal reconnu. Cette acidification, plus importante sans doute dans les premières secondes suivant l'ajout d'acide, serait de nature à induire les systèmes d'hydrolyse des sucres de réserves comme décrit par Valle (1986), ces systèmes étant beaucoup plus actifs dans la phase a que dans la phase b (Figure 31).

III.9.3. Retour progressif à un métabolisme balancé : accumulation des sucres de réserves

Durant la phase c, la q_{O_2} reste à une valeur inférieure à la valeur théorique pendant 50 minutes. Cette phase se déroule après une complète consommation de l'acide propionique du milieu de culture et les levures commencent une phase de reconstruction de réserves. Le flux de glucose, dévié vers l'accumulation de tréhalose et de glycogène correspondrait à 10 % du flux global, ce qui est en accord avec la diminution de 10 % de la vitesse de consommation d'oxygène par rapport à la valeur théorique. Cette réorientation du flux de carbone est en accord avec des niveaux élevés de tréhalose-6-P, un ratio pyruvate/PEP revenu à sa valeur initiale et une activité réduite du cycle de Krebs. Le fait le plus surprenant durant cette phase est l'extrusion incomplète des cations qui ne sont plus requis pour le contrôle de l'acidification cytosolique. De plus, cette observation semble contradictoire avec l'homéostasie osmotique précédemment décrite. Toutefois, d'une part l'épuisement en acide peut conduire à une alcalinisation du cytosol bloquant l'induction des tréhalases et d'autre part, il n'est pas improbable qu'une compartimentation intracellulaire des ions potassium puisse intervenir.

III.9.4. Retour à l'état initial, rétention vacuolaire des cations

Durant la phase d, les paramètres macrocinétiques, les métabolites intracellulaires et les réserves intracellulaires retournent à leurs valeurs précédant la perturbation. La différence majeure est la concentration intracellulaire en potassium qui reste élevée (340

mM). Le potassium intracellulaire piégé peut être expliqué probablement par sa redistribution intracellulaire ainsi, la salinité en excès et l'alcalinisation dépendante n'affecteraient pas la physiologie cellulaire. Nous pouvons supposer une accumulation vacuolaire comme précédemment décrite pour les ions Na^+ pour une régulation d'un stress osmotique chez *S. cerevisiae* (Klionsky et coll., 1990) ou pour les ions K^+ et Mg^{2+} chez *Saccharomyces carlsbergensis* (Okorov et coll., 1980). La demande énergétique requise pour ce transport vacuolaire ne représenterait, comme précédemment montré qu'un équivalent énergétique très faible par rapport à l'énergie totale disponible et, durant la phase c, ce supplément respiratoire requis serait masqué par la redistribution des flux vers les réserves hydrocarbonées.

III.9.5. Le deuxième pulse semble indiquer une pression de turgescence critique

Après le second pulse dans le réacteur, la dynamique de la réponse est globalement identique à celle du premier pulse avec une séquence d'événements accélérée suite à une plus forte concentration cellulaire (60 g.L^{-1} pour le second pulse versus 40 g.L^{-1} pour le premier). En dépit de conditions opératoires identiques, le facteur d'accumulation est plus faible et le pH_i est légèrement inférieur à celui calculé pour le premier pulse. L'entrée du potassium est moins importante mais la concentration finale atteinte est identique à celle obtenue pour le premier pulse. Cela semble montrer une mobilisation du potassium accumulé dans les vacuoles avec une plus faible neutralisation de l'acide attestée par un plus faible pH . De plus, nous observons une plus faible dissipation d'énergie exprimée par un $Y_{\text{Acide,ATP}}^*$ plus petit (Tableau 18). Ce phénomène peut être expliqué par une pression de turgescence critique qui limiterait le transport du potassium exogène mais qui, au vu du comportement cinétique, suppose une mobilisation du potassium vacuolaire précédemment évoquée.

Les taux de croissance utilisés dans cette étude correspondaient à une capacité respiratoire de la levure supérieure à la respiration « in situ » afin d'éviter une bascule du métabolisme vers le fermentaire. Les concentrations en acide propionique permettaient une réponse physiologique compatible avec une activité de croissance. La courte phase transitoire de diffusion de l'acide (15 min) est caractérisée par une augmentation de la respiration avec une dissipation d'énergie en grande partie liée à l'activité ATPasique et dans une plus faible mesure au transport du potassium et du magnésium. Cette phase se termine lorsqu'une entrée massive de potassium est suffisante pour rétablir un pH_i proche des valeurs physiologiques couramment admises. Le mode de culture fed-batch a permis d'observer une suite de séquences métaboliques indépendantes du phénomène

premier d'acidification : dégradation des carbohydrates probablement liée à une augmentation de la pression de turgescence et reconstitution du pool de réserves après consommation totale de l'acide. Le fait marquant est la non-exportation exocellulaire du potassium accumulé durant la première phase qui suppose une rétention vacuolaire. Ainsi, comme l'attestent les différents niveaux d'observation, le retour à un métabolisme balancé exige une durée importante (plusieurs heures) après la première réponse à la diffusion de l'acide faible.

IV. Mécanismes d'« adaptation » de la levure

Notre objectif était de connaître les potentialités de la levure hors réacteur, en terme de respiration (capacité respiratoire) et de production d'éthanol (capacité fermentaire) en présence ou non d'acide. Pour cela, nous avons prélevé en phase exponentielle de croissance sur les cultures de type fed-batch des cellules ayant été exposées ou non à l'acide propionique dans le réacteur. Ces tests devraient permettre de différencier des cellules dites « adaptées » à l'acide des cellules non adaptées. L'hypothèse est de quantifier, suite à un pulse d'acide propionique, l'inhibition ou l'accroissement des capacités respiratoires et fermentaires de la levure (pic de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène) et ce, de façon significative selon le degré d'adaptation de la levure.

IV.1. Respiration de la levure hors réacteur

Des cellules prélevées en phase exponentielle de croissance sont injectées dans un respiromètre (cf. § III.9.2., Matériel et Méthodes) permettant de suivre leur consommation d'oxygène (diminution de la p_{O_2}) en conditions de non limitation de carbone (concentration inférieure à la concentration induisant l'effet « Crabtree »). Des ajouts d'acide propionique sont effectués dans la cuve pour étudier l'incidence de cet acide sur la respiration cellulaire hors réacteur.

Les différents tests sont réalisés sur deux milieux différents ; le milieu salin initial utilisé pour les cultures fed-batch et le milieu M1 servant aux analyses de la capacité fermentaire. Trois différences majeures sont à noter entre ces deux milieux, le pH, la pression osmotique et la concentration en sels. En effet, le premier milieu est à un pH de 4,5 et une pression osmotique de 117 milliosmol.kg d'eau⁻¹ alors que le second est à un pH de 6,3 et une pression osmotique de 1662 milliosmol.kg d'eau⁻¹. Afin de savoir si les réponses des micro-organismes dépendaient du pH du milieu de culture, le milieu salin a été ajusté à pH 5 et 6,3 pour d'autres expérimentations. La température de travail est maintenue constante à 30°C (Tableau 19).

Tableau 19 : Conditions des tests de respirométrie.

Milieu	Test de respirométrie		Temp (°C)	Phase de croissance cellulaire
	Pression osmotique	pH		
M 1	forte	6,3	30°C	Exponentielle et/ou ayant subi un stress acide ou non
Salin	faible	4,5		
		5		
		6,3		

Les métabolites potentiels de fermentation au cours de la culture ont été analysés par CPG dans les milieux de respirométrie. L'éthanol n'est que faiblement détecté dans les surnageants, la concentration est à la limite de la détection de la CPG. La concentration d'acide acétique est relativement faible et comprise entre 0 et 25 mg.L⁻¹. Il n'existe aucune corrélation entre les concentrations des métabolites et l'acide propionique introduit dans le puits lors du test.

Afin de pouvoir comparer les différents résultats, la vitesse spécifique de consommation de l'oxygène est normée par rapport à la vitesse spécifique maximale obtenue dans le puits témoin réalisé à chaque test (puits dans lequel le milieu et les cellules sont introduits en absence d'acide). Pour s'affranchir du temps de l'expérimentation qui est fonction du taux d'inoculation et de la concentration en acide injectée, les vitesses sont exprimées en terme d'avancement de réaction en fonction de la valeur initiale en oxygène dissous ($1 - \frac{O_{2t}}{O_{2t=0}}$).

IV.1.1. Dynamiques de réponse en respirométrie

La respiration initiale observée sur milieu à forte pression osmotique est légèrement inférieure à celle obtenue sur milieu salin (respectivement de 6 et 6,5 mmoles.g de biomasse⁻¹.h⁻¹).

Selon le milieu utilisé, le type de réponse observé est totalement différent. En effet, avec le milieu salin, la vitesse spécifique est divisée par un facteur 2 après le pulse d'acide propionique, mais réaugmente progressivement pour atteindre un maximum (appelé maximum en présence d'acide) au bout de 1 heure pour une concentration en acide de 7 mM et après 1,5 h avec une concentration en acide de 14 mM (Figure 33.A.). Pour une concentration de 27 mM, la respiration est inhibée de 80 %.

En revanche, pour le milieu à forte pression osmotique, la vitesse spécifique est diminuée par rapport à la vitesse spécifique initiale mais reste constante dans la suite de l'expérimentation (Figure 33.B.). Pour une concentration d'acide de 68 mM, la vitesse de respiration n'est inhibée que de 40 %. Les variations de la respiration observée à 0,08 de temps d'avancement sur la figure 33.B sont dues à la réponse de la sonde suite au pulse d'acide. La chute brutale de la vitesse spécifique en fin de test est due à l'épuisement de l'oxygène dans la cuve de respirométrie.

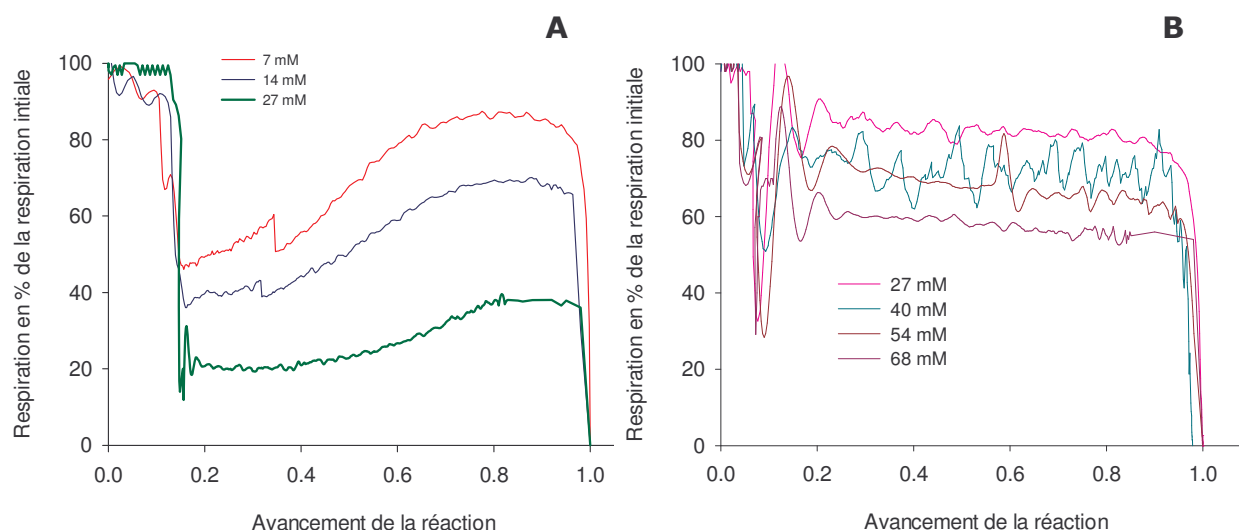


Figure 33 : Dynamiques de respiration hors réacteur sur milieu salin pH 5 (A) et sur milieu à forte pression osmotique pH 6,3 (B) suite à un pulse d'acide propionique pour différentes concentrations.

L'effet de l'acide est observé dès 7 mM d'acide propionique sur le milieu salin où la vitesse est diminuée de 50 %. En revanche, sur le milieu à forte pression osmotique, un effet notable est remarqué à une concentration de 54 mM d'acide (Figure 33.B.), mais la vitesse spécifique n'est diminuée que de 25 %.

Il est à noter que, contrairement à la réponse obtenue en fermenteur, la respiration est instantanément inhibée en présence d'acide faible.

IV.1.2. Influence du pH

L'influence du pH a été testée sur le milieu minimum pour trois pH différents. Les capacités respiratoires initiales ($q_{O_2 \text{ initiale}}$) mesurées juste après injection des cellules dans le respiromètre aux différents pH indiquent un accroissement de 8 % à pH 5 et de 14 % à pH 6,3 par rapport au niveau respiratoire à un pH de 4,5. Ainsi, indépendamment de l'ajout d'acide propionique, ces valeurs initiales indiquent une influence du pH sur la respiration. Afin de s'affranchir de cette disparité, les vitesses de respiration mesurées après les ajouts d'acide sont reportées en pourcentage de la capacité respiratoire initiale. Les vitesses de respiration indiquées sur la figure 34, en fonction du pH, correspondent

aux vitesses maximales obtenues en présence d'acide comme décrites dans le paragraphe précédent.

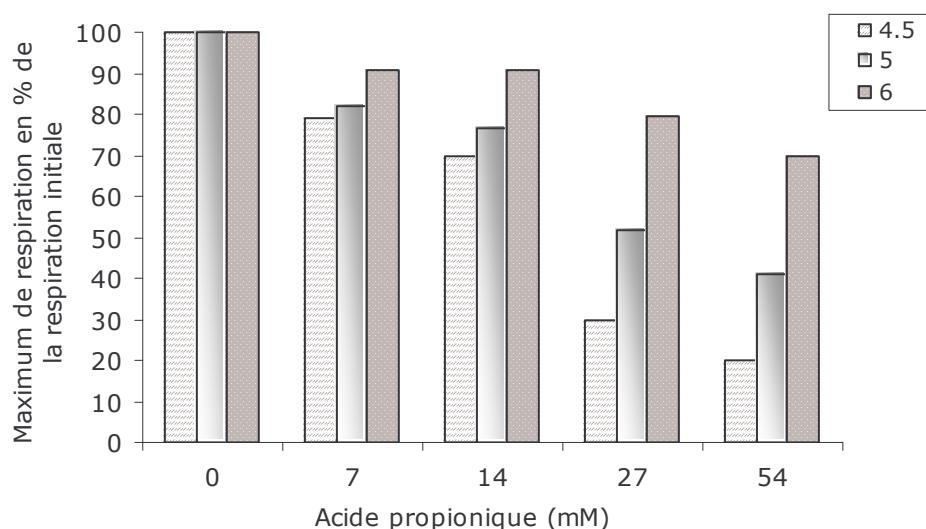


Figure 34 : Effets couplés du pH et de l'acide propionique sur la respiration hors réacteur sur milieu salin pour des cellules prélevées à un taux de croissance de $0,1 \text{ h}^{-1}$ et à un pH de 5.

L'acide propionique présente un effet inhibiteur général sur la respiration cellulaire plus marqué à pH 4,5 qu'à des pH plus élevés. L'inhibition de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène est d'autant plus importante dans le milieu salin à faible pH, et ce phénomène est accentué lorsque la concentration en acide augmente. Ainsi, pour 54 mM d'acide propionique, l'inhibition de la respiration à pH 4,5 est de 80 % alors qu'elle n'est que de 30 % pour un pH de 6,3.

IV.1.3. Influence du « vécu » de la levure

Nous avons effectué ce test hors ligne sur des cellules provenant de cultures fed-batch ayant subi un stress acide dans le réacteur. Ces levures montrent la même inhibition de la respiration en présence d'acide propionique, et ce sans aucune différence du pourcentage d'inhibition quel que soit le milieu de test utilisé. La levure ayant déjà subi un stress acide ne montre pas une augmentation de sa capacité respiratoire hors fermenteur.

IV.1.4. Conclusions sur la capacité respiratoire hors ligne de la levure

En premier lieu, il est à noter que, contrairement à la réponse obtenue en fermenteur, la respiration est instantanément inhibée et non accélérée suite à un pulse d'acide. Si les conditions opératoires dans le respiromètre ont été choisies pour maintenir un métabolisme purement oxydatif, les dynamiques précédemment décrites lors des

expérimentation en fermenteur montrent que le catabolisme de la source carbonée est fortement perturbé dès l'ajout d'acide. Les vitesses spécifiques de la respiration initiale de 6 à 6,5 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ correspondent à des vitesses spécifiques obtenues en cultures oxydatives pour des taux de croissance proches de la valeur sub-critique décrite par Guillou (1996). Dans ce cas, l'augmentation du flux glycolytique due à la mobilisation des réserves peut entraîner une bascule vers un métabolisme de type oxydo-réductif (qui est difficile à quantifier par les co-produits du fait d'une très faible concentration cellulaire utilisée pour les essais) et conduisant à une réduction de la vitesse de respiration. Introduire une limitation du flux carbone par la réduction de la concentration initiale de glucose pourrait être une solution mais difficilement interprétable car cela correspondrait à une variable dont l'évolution devrait être quantifiée séparément pour chaque essai. La dynamique de respiration sur milieu minimum (réaugmentation de la vitesse de respiration) laisse supposer un phénomène d'« adaptation » qui, selon le temps de réponse, semble impliquer une régulation majeure voire une réorganisation de voies métaboliques. Ces phénomènes seraient *a priori* compensés voire atténués par l'exposition à une forte pression osmotique comme en attestent la différence de dynamiques de respiration et l'inhibition apparente moins forte.

La capacité respiratoire de la levure étant inhibée pour de plus fortes concentrations en acide sur un milieu à forte pression osmotique laisse penser que la pression osmotique du milieu joue un rôle important dans la réponse à l'acide. Les mesures respirométriques font apparaître des réponses qui semblent, qualitativement et quantitativement, dépendre fortement de la nature physico-chimique du milieu expérimental et révèlent que le concept de pression osmotique semble affecter notablement la réponse de la cellule à un stress acide.

D'un point de vue pratique, il est impossible, d'après les mesures respirométriques de différencier et de quantifier les modifications physiologiques induites par une première exposition à l'acide lors de cultures en réacteur.

IV.2. Capacité fermentaire à forte pression osmotique

Nous voulons déterminer la capacité de la levure à produire de l'éthanol dans des tests à forte pression osmotique mimant ainsi l'utilisation de la levure dans un processus de panification. Ce test est composé de deux essais, un en présence d'acide propionique et un en absence (témoin). Pour toutes les cultures en réacteur précédemment citées ce test a été réalisé avec des prélèvements effectués régulièrement au cours de la culture (cf. § III.7., Matériel et méthodes).

IV.2.1. Inhibition de la capacité fermentaire pour des cellules cultivées en absence d'acide

Pour des cellules n'ayant jamais été en contact avec l'acide propionique prélevées d'une culture de type fed-batch en limitation glucose, dans le test hors ligne en présence d'acide, la production d'éthanol est observée avec un temps de retard par rapport à la capacité mesurée sans acide (Figure 35).

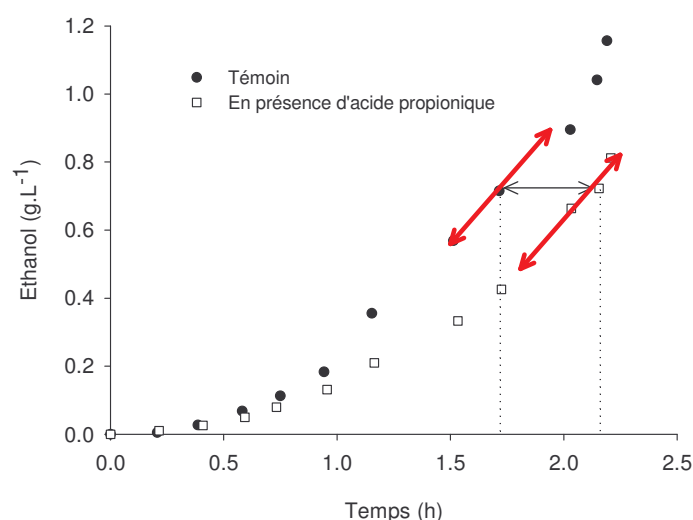


Figure 35 : Evolution de la concentration en éthanol lors du test de capacité fermentaire en présence et en absence d'acide propionique.

Ce retard de production d'éthanol (évalué à 30 min après deux heures d'incubation) peut être expliqué par deux phénomènes, soit par une inhibition du transport du sucre par l'acide en métabolisme fermentaire comme décrit par Rossel et coll. (2002) soit que, dans des conditions de pressions osmotiques très drastiques, la levure en présence d'acide requiert une période d'adaptation afin de réguler son pH_i qui, en supposant une restauration de sa capacité fermentaire ultérieure peut être définie comme une phase de latence.

IV.2.2. Les levures ayant été exposées à l'acide montrent temporairement une plus faible inhibition de la capacité fermentaire.

Ce test, réalisé tout au long des cultures par prélèvements réguliers du fermenteur, nous a alors permis de suivre la potentialité de production d'éthanol en métabolisme fermentaire selon le vécu de la levure dans le réacteur (absence ou présence d'acide).

En croissance exponentielle à un taux de croissance fixé ($0,05 \text{ h}^{-1}$), la production d'éthanol hors réacteur est de $0,75$ et $0,4 \text{ g.g de biomasse}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement pour le témoin et en présence d'acide propionique avant le pulse d'acide dans le réacteur soit

une différence entre les deux tests de $0,35 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figure 36). Cependant, pour les tests témoins, les cellules prélevées en phase b de la respiration ayant subi les stress acides montrent une activité fermentaire légèrement accrue de 10 % alors que les cellules en phase c ont une capacité égale à la capacité initiale. Ceci concorde avec l'induction de la dégradation des sucres de réserves et donc d'un flux glycolytique accru.

Lors des tests en présence d'acide, la capacité fermentaire des cellules récoltées en phase b est augmentée au maximum de 25 et 50 %, respectivement pour les deux ajouts mais reste nettement inférieure à celle mesurée dans les témoins. La différence entre les deux tests (témoin et présence d'acide) de $0,3$ et $0,2 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. respectivement pour les deux pulses. Cette tolérance accrue à l'acide doit donc être interprétée comme une réduction de son effet inhibiteur apparent et selon l'analyse cinétique du précédent paragraphe, par une réduction du temps de latence induit par l'acide en métabolisme fermentaire.

Néanmoins, l'augmentation de la production d'éthanol en présence d'acide est visible 20 minutes après le pulse dans le réacteur. Il existe, ici également un retard entre le pulse et l'augmentation de la production d'éthanol. Cette meilleure production est donc maximale durant la phase b, décline durant la phase c pour revenir à la valeur initiale en début de phase d. Par ailleurs, il semblerait qu'il reste une adaptation résiduelle qui laisse supposer un état physiologique spécifique susceptible d'obtenir une production d'éthanol relativement plus importante observée lors du second pulse d'acide.

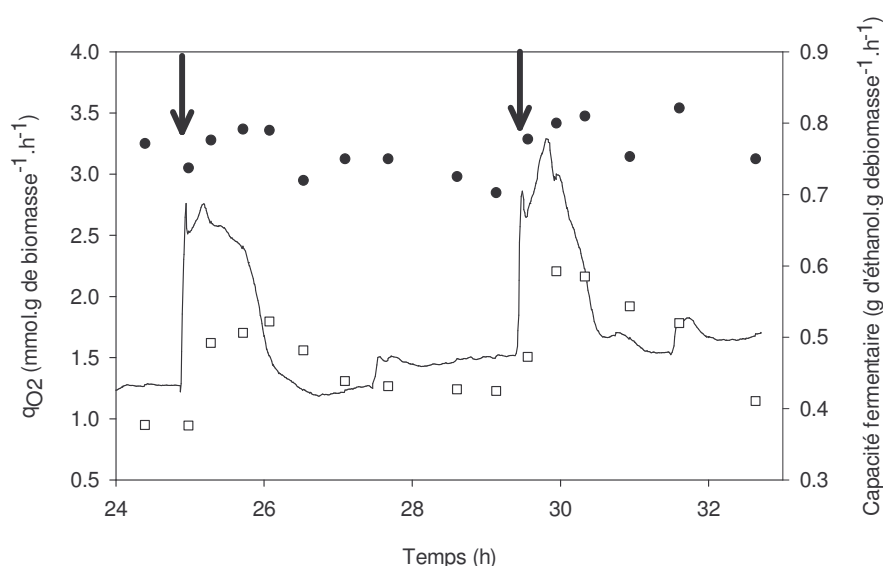


Figure 36 : Evolution de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène dans le réacteur (—), de la production d'éthanol test témoin (●) et test en présence d'acide propionique (□) sur la culture pH 5 et $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Les flèches indiquent les pulses d'acide propionique dans le réacteur.

Suite au temps de retard observé pour la surproduction d'éthanol, nous pouvons penser qu'il correspond à une modification de la physiologie cellulaire susceptible

d'atténuer l'effet inhibiteur de l'acide sur le catabolisme. Cette atténuation, que l'on qualifiera d'adaptation, non instantanée et transitoire peut être, quantitativement, en partie attribuée à un flux de carbone additionnel dû à la consommation des réserves. Mais sa dynamique en adéquation avec l'évolution temporelle du contenu en potassium cytosolique disponible semble prouver que son origine est bien dans la capacité des cellules à maintenir une homéostasie du pH_i par une accumulation de cations. La stimulation de la capacité fermentaire après une exposition à l'acide, pour le test hors ligne en présence d'acide, serait donc un recouvrement partiel de la capacité fermentaire par un potentiel intracellulaire acquis assurant une restauration plus rapide de son pH_i plutôt qu'une augmentation de la performance cellulaire ou de la mise en place d'un métabolisme spécifique. Cette hypothèse a déjà été soulignée par Ferreira et coll. (1997).

IV.2.3. Présence d'un débit constant d'acide

A partir des observations précédentes, l'adaptation maximale semble être corrélée à la phase de dégradation de l'acide propionique (phase b). Nous voulions déterminer si l'adaptation pouvait être maintenue pour un état physiologique correspondant à la mise en place de mécanismes de dégradation de l'acide par la levure. Pour cela, nous avons imposé, 30 minutes après un pulse d'acide (6,7 mM), la présence d'un débit constant d'une solution d'acide propionique arrêté à 30,9 h de culture. Ce débit a été calculé à partir de la vitesse de consommation de l'acide propionique observée sur les précédentes expérimentations. Nous ne voulions pas d'accumulation d'acide dans le réacteur, la vitesse de consommation imposée est donc légèrement inférieure à la vitesse de dégradation moyenne soit $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{g} \text{ de biomasse}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

IV.2.3.a. Résultats de la culture

En ce qui concerne les variables macroscopiques, nous pouvons observer qu'une pression constante d'acide n'implique pas une respiration constamment augmentée (Figure 37.A.). En effet, le débit constant d'alimentation n'empêche pas le retour à la normale des vitesses de respiration. Nous n'observons aucune variation du coefficient respiratoire qui reste à une valeur proche de 1. Pendant la phase de pulse et de débit d'acide, le glucose ne s'accumule pas dans le réacteur. L'arrêt de l'apport d'acide ne provoque aucun changement du métabolisme de la levure (Figure 37).

Nous n'observons donc aucune accumulation de l'acide dans le surnageant de culture, ce qui confirme que le débit constant calculé correspondait bien à la capacité cellulaire de dégradation pour obtenir sa totale consommation.

Le dosage des sucres de réserves montre que suite au pulse d'acide, comme précédemment observé, une dégradation survient. Mais 1 h après le pulse, en dépit de la présence du débit constant d'acide, nous observons une re-accumulation des réserves.

La consommation du glycogène et du tréhalose est donc apparemment due au choc causé par l'injection d'acide dans le milieu et non liée à la consommation de l'acide propionique (Figure 37.B.).

Les concentrations mesurées en cations (magnésium et potassium) présentent une accumulation suite au pulse d'acide comme précédemment décrit (Figure 33.A.).

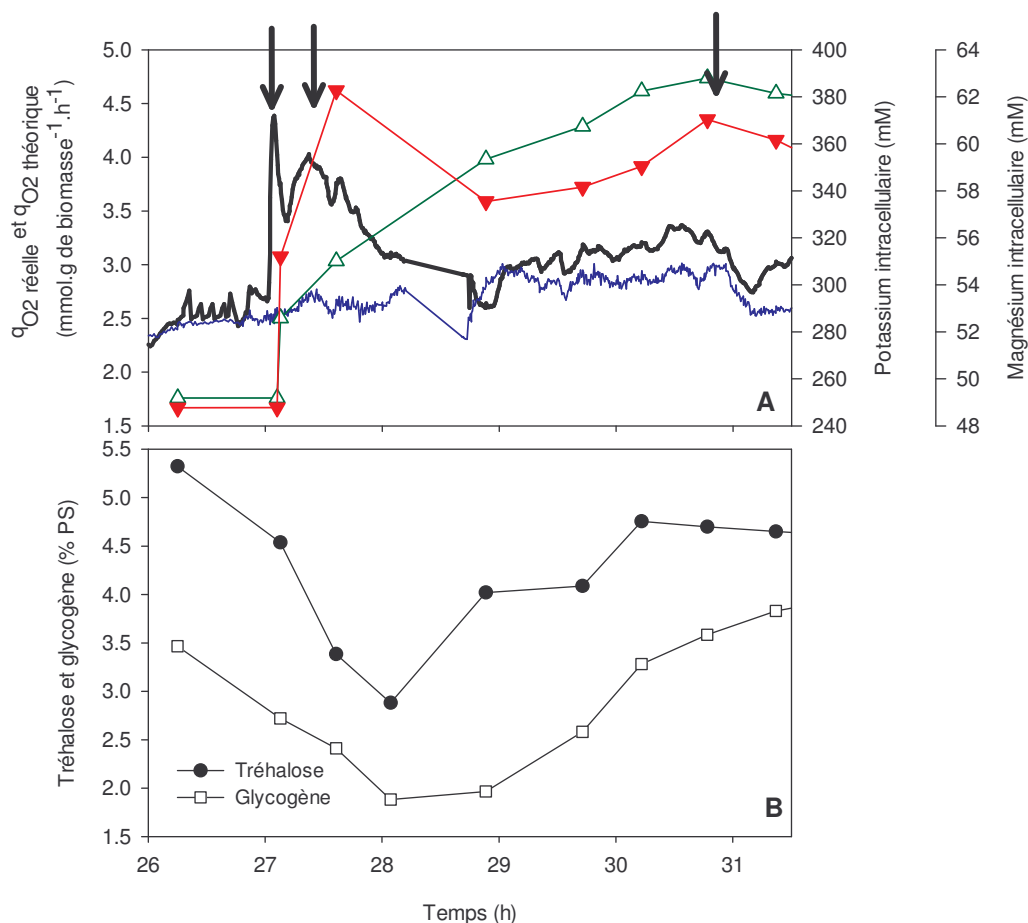


Figure 37 : Dynamique de réponse à un pulse suivi d'un débit constant d'acide propionique. A : Evolution des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène réelle (—) et théorique (—) et des concentrations intracellulaires en potassium (\triangle) et magnésium (∇). B : Evolution des sucres de réserves. Le pulse d'acide, la mise en marche du débit constant et son arrêt sont indiqués par les flèches. Culture réalisée à pH 5 et $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Nous retrouvons un premier accroissement de la concentration intracellulaire en potassium rapide d'environ 80 mM comme décrit précédemment suivi par une accumulation plus lente jusqu'à 380 mM tout au long de la phase d'alimentation en acide. La concentration intracellulaire en potassium augmente progressivement au cours de l'application du débit pour atteindre une valeur maximale de 380 mM qui ne diminue pas suite à l'arrêt de l'apport d'acide. En revanche, l'évolution de la concentration en magnésium ne suit pas les mêmes variations que celles décrites précédemment, elle atteint un maximum 2 h après le pulse puis diminue légèrement tout en restant à une concentration supérieure à celle précédant le pulse. Le magnésium pourrait avoir un effet catalytique sur les enzymes qui interviennent dans la dégradation de l'acide propionique.

En effet, le magnésium est connu pour être un activateur pour de nombreuses enzymes de la glycolyse, des ATPases membranaires et des enzymes de réplication intervenant dans le cycle cellulaire (Mesecar et Nowak, 1997 ; Serrano, 1978, Walker, 1994).

IV.2.3.b. Mesure de la capacité fermentaire de la levure

La capacité fermentaire hors réacteur est de 0,75 et 0,4 g.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ respectivement en absence et en présence d'acide, valeurs identiques à la culture de référence (Figure 38). Comme précédemment décrit, une meilleure production d'éthanol est observée après le pulse d'acide dans le réacteur pour le test en présence d'acide propionique. Cette « adaptation » n'est plus visible 2,5 heures après le pulse en dépit de la présence d'acide propionique et de sa dégradation. Manifestement, l'« adaptation » reste un mécanisme transitoire et la présence d'acide propionique ne permet pas de prolonger ce phénomène.

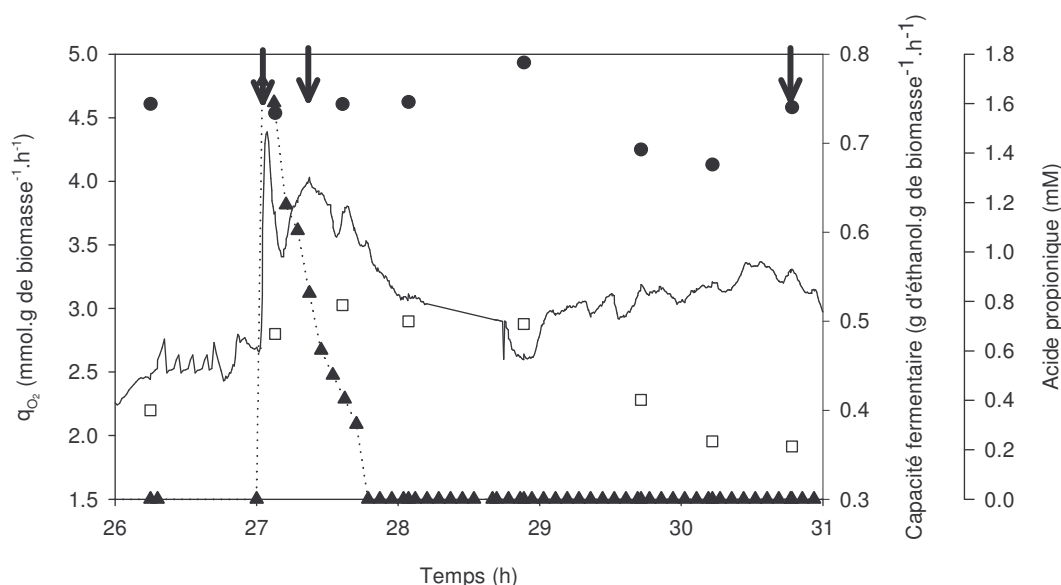


Figure 38 : Evolution de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène dans le réacteur (—) et de la production d'éthanol hors réacteur en absence (●) et en présence d'acide propionique (□) et de la concentration en acide propionique (▲) sur la culture pH 5 et $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$. Les flèches indiquent le pulse d'acide propionique dans le réacteur, la mise en marche du débit constant et son arrêt.

IV.3. Conclusion

Les observations obtenues sur la capacité fermentaire de la levure pourraient paraître contradictoires avec la physiologie de la levure. En effet, la levure requiert de l'énergie pour maintenir son pH_i et sa pression de turgescence dans ces conditions de forte pression osmotique et de stress acide comme le montrent les réponses obtenues en fermenteur en métabolisme oxydatif. Or, en métabolisme fermentaire, cette production d'énergie correspond à une production d'éthanol donc nous aurions dû observer une production d'éthanol identique voire supérieure dans le cas où la levure est mise en

présence de l'acide. Mais, la production d'éthanol est fortement diminuée. Ce phénomène peut s'expliquer soit par une inhibition du transport du glucose par l'acide soit par une incapacité dans ces conditions de forte pression osmotique à réguler instantanément son pH_i conduisant à la phase de latence précédemment décrite. Cette phase de latence paraît similaire à celle obtenue en respirométrie, où nous observons une restauration progressive de la vitesse de respiration. Le retour tardif à la production spécifique d'éthanol basale suppose qu'en métabolisme fermentaire l'utilisation directe de l'énergie disponible sous forme d'ATP n'est pas suffisante pour rétablir instantanément un pH physiologique optimal. Toutefois, cette régulation du pH intracellulaire pourrait faire intervenir les mêmes mécanismes de transport de cations participant à la neutralisation de l'acide intracellulaire accumulé, mais la disponibilité en protons cytosoliques, beaucoup plus faible pouvant être obtenue par la respiration, devrait à l'origine de la latence observée.

L'analyse de la dynamique de la réponse cellulaire au stress acide a permis de distinguer quatre phases caractéristiques de mécanismes différenciés selon une séquence en adéquation avec les différentes observations reportées dans la littérature :

- La régulation du pH intracellulaire est effectuée par une réexportation exocellulaire des protons probablement par une activité ATPasique avec une dissipation futile d'énergie pour faire face à la dynamique de diffusion de la forme protonée de l'acide. L'accumulation concomitante de cations, principalement du potassium, couplée à une exportation de protons correspond à une neutralisation de l'acide et donc à l'obtention d'un état d'équilibre.
- La consommation de l'acide propionique avec une induction de la mobilisation des sucres de réserves a pour origine la nécessité de faire face à une pression de turgescence accrue par l'accumulation de sels de propionate.
- La reconstitution des réserves est associée à une extrusion des cations, partielle en ce qui concerne le potassium.
- Le retour à un métabolisme balancé quelques heures après le pulse montre une teneur en potassium nettement supérieure à la valeur physiologique mesurée avant le pulse ce qui laisse supposer une compartimentation vacuolaire de ce cation.

Une dégradation constante de l'acide ne permet pas de pérenniser l'adaptation obtenue en métabolisme oxydatif et ne semble pas être déterminante pour augmenter la capacité fermentaire. L'élément clé de l'acquisition d'un potentiel de meilleure production n'est donc pas une physiologie associée à la consommation de l'acide mais vraisemblablement une modification du potentiel cellulaire induit par la diffusion et

l'accumulation cytosolique de l'acide. Malgré la présence (en phases c et d) et son accumulation continue, obtenue par un apport continu d'acide, le pool de potassium cellulaire ne permet ni de pérenniser ni d'augmenter l'« adaptation » quantifiée par le test fermentaire.

L'interprétation cinétique faite du test d'adaptation montre l'existence d'une phase de latence pouvant résulter d'une perte de capacité fermentaire liée à l'acidification cytosolique avant la restauration d'un pH_i assurant le potentiel fermentaire du témoin. L'adaptation des cellules face à une seconde exposition à l'acide serait ainsi définie comme une réduction de ce temps nécessaire à rétablir une homéostasie optimale. L'analyse dynamique de l'acquisition et de la perte de cette adaptation pour des cellules ayant subi un stress acide en mode oxydatif montre qu'elle est parfaitement corrélée à sa teneur potentielle en cations disponibles, et plus particulièrement en potassium. Ces cations sont aptes à neutraliser instantanément un flux additionnel d'acide et préviennent ainsi une acidification cytosolique drastique. Ce pool ne peut se réduire à une teneur massique en cations mais doit prendre en compte une potentielle répartition liée à la compartimentation cellulaire et selon toute vraisemblance à une possible séquestration vacuolaire.

Chapitre III : Implication de l'énergétique cellulaire dans la réponse au stress acide et à l'« adaptation »

I. Introduction

Les cultures en régime oxydatif montrent un rôle important de l'énergétique cellulaire lors de la réponse primaire à un stress acide alors qu'elle ne semble pas avoir une part prépondérante dans le mécanisme d'adaptation. Afin d'obtenir des réponses plus marquées, les expérimentations suivantes devraient permettre de mieux quantifier la redistribution du flux de carbone suite à la demande énergétique imposée par l'acidification cellulaire et de mieux quantifier cette énergie en trouvant dans le métabolisme oxydo-réductif la génération de l'énergie chimiquement couplée au catabolisme du substrat. Pour cela, deux états métaboliques ont été testés : un métabolisme oxydatif en carence azote qui draine le carbone vers l'accumulation de sucres de réserves et un métabolisme oxydo-réductif avec une vitesse de respiration imposée.

Nous avons observé la dégradation des sucres de réserves suite à un pulse d'acide propionique en métabolisme purement oxydatif ; en effet le pulse d'acide provoque la dégradation de 50 et 38 % respectivement des contenus intracellulaires en tréhalose et en glycogène. Deux questions principales se posent : est-ce la teneur initiale en sucres de réserves qui détermine leur amplitude de la dégradation ? Et est-ce que la présence d'une forte quantité de tréhalose qui est connu pour être un osmoprotecteur influe sur la réponse macroscopique à un pulse d'acide ? Lors d'une phase de culture réalisée en carence d'azote, le flux de carbone est réorienté vers la synthèse de carbohydrates de réserves avec une demande anabolique carbonée et énergétique fortement réduite. La production d'énergie étant très faible en rapport au potentiel de la phosphorylation oxydative, les mécanismes d'augmentation de respiration et éventuellement de mobilisation des réserves devraient en être relativement amplifiés.

Dans un second temps, nous avons voulu évaluer la réponse à un stress acide en métabolisme respiro-fermentaire. Dans la littérature, il est décrit que l'ajout d'acides faibles en anaérobiose provoque une surproduction d'éthanol et une diminution du rendement en biomasse (Verduyn et coll., 1990a et 1990b). Dans ce cas de figure, l'énergie nécessaire à la levure pour réguler son pH_i et pour faire face à l'acide n'est pas amenée par une augmentation de la respiration mais par une surproduction d'éthanol. Notre objectif est d'imposer une vitesse de respiration en limitant le flux de carbone et l'oxygène disponible conduisant à une co-production d'énergie par voie fermentaire. Suite à un pulse d'acide, nous voulons déterminer si le surplus énergétique requis est indispensable, et si oui son origine, et dans ce cas précis, nous souhaitons connaître la part de l'énergie apportée par la respiration et par la production d'éthanol.

II. Rôle des réserves intracellulaires

Les carbohydrates sont connus pour s'accumuler intracellulairement en phase de limitation ou de carence nutritionnelle (comme décrit dans le § I.1.6.c., Etude bibliographique). Nous avons choisi de carencer la levure en azote pour simuler un procédé de production de levures de boulangerie, dans des conditions expérimentales proches du procédé industriel avec une maîtrise du devenir du carbone dans ces conditions. Un stress acide identique à celui de la culture de référence est appliqué sur ces levures carencées, ce qui nous permet d'évaluer l'implication énergétique des sucres de réserves suite à un stress acide.

II.1. Conduite de la culture

Le début de la culture a été réalisé comme pour toutes les autres cultures jusqu'à l'obtention de 40 g.L⁻¹ de biomasse. Le milieu salin est calculé de sorte que les ions ammonium nécessaires à la croissance soient apportés par la régulation pH. Pour arrêter cet apport, le pH n'est plus régulé par de l'ammoniaque mais par de la potasse 10 N (Figure 39). Suit alors une phase de consommation des ions ammonium résiduels qui se sont légèrement accumulés pendant la croissance (Phase 2) puis une phase de carence durant laquelle les réserves intracellulaires s'accumulent (Phase 3). Pendant cette phase, le flux de substrat envoyé est régulé pour prévenir une bascule vers le métabolisme fermentaire et pour favoriser l'accroissement de la teneur en réserves intracellulaires. Afin d'obtenir une vitesse de respiration de référence stable indispensable à l'analyse du pulse d'acide propionique, le flux de glucose est imposé constant (Phase 4). Cette conduite a permis d'atteindre des teneurs en tréhalose et glycogène respectivement de 16 et 12 % PS en 1,5 heure avec une accumulation des deux sucres concomitante à la carence comme décrit par Parrou et coll. (1999) (Figure 42). La concentration en tréhalose atteinte est proche des valeurs obtenues industriellement qui sont comprises entre 15 et 20 % PS (Gélinas et coll., 1989).

Afin d'étudier cette culture, il convient d'exprimer la variable biomasse en deux composantes : $Biomasse\ totale = Biomasse\ vraie + Réserves$; toutes les vitesses spécifiques sont donc calculées à partir de la biomasse vraie. Le volume intracellulaire a été calculé pour différents temps de la culture et il est proche de 1,5 mL.g de biomasse⁻¹, valeur identique à celle obtenue en métabolisme oxydatif pur.

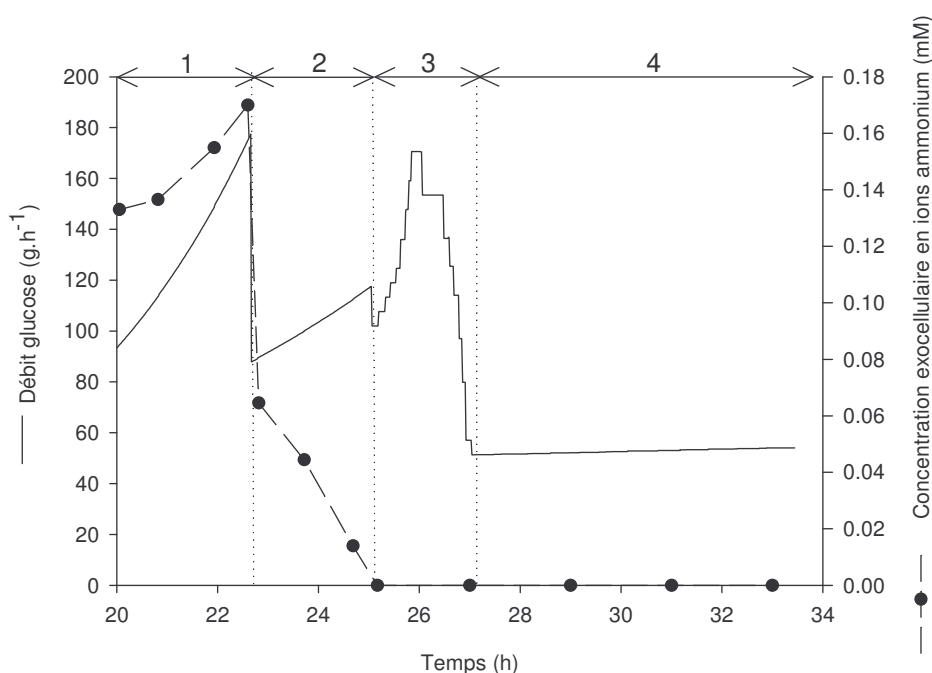


Figure 39 : Débit de glucose et concentration exocellulaire en ions ammonium au cours d'une culture en condition de carence azote. Phase 1 : accroissement de la concentration cellulaire, phase 2 : consommation des ions ammonium, phase 3 : accumulation de réserves intracellulaires, phase 4 : débit constant de glucose.

II.2. Résultats

II.2.1. Variables macroscopiques

La q_{O_2} basale de $1 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, voisine de celle obtenue pour un taux de croissance de $0,05 \text{ h}^{-1}$ correspond bien aux objectifs souhaités de réduction de la vitesse spécifique de production d'énergie. Le rendement de conversion du substrat en réserves pendant la phase de carence est de $0,4 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ (Tableau 20).

Tableau 20 : Rendements de conversion du substrat en CO_2 et en réserves pendant la phase de carence azote.

Rendement	Cmol.Cmol^{-1}
R_{SCO_2}	0,36
$R_{\text{Sréserves}}$	0,4

Lors de la phase de carence azote et d'accumulation des réserves, le rendement en ATP calculé sur la base de la consommation de l'oxygène est de $0,53 \text{ Cmoles de réserves.mol d'ATP}^{-1}$. La valeur théorique de ce rendement est voisine de $1,5 \text{ Cmoles.mol d'ATP}^{-1}$, ce qui implique que dans notre cas, 65 % de l'énergie produite n'est pas impliquée dans la voie de biosynthèse des sucres de réserves. Cette différence entre anabolisme et catabolisme a déjà été reportée par Larsson et coll. (1997). Cette énergie

supplémentaire pourrait provenir de l'existence d'une consommation d'énergie par une réaction de maintenance élevée suite à une pression osmotique intracellulaire élevée (qui sera discutée dans les paragraphes suivants). Suite aux pulses d'acide propionique (6,7 mM), la vitesse de respiration suit les mêmes variations précédemment décrites pour les cultures réalisées en oxydatif en seule limitation glucose (Figure 40.A). La vitesse de respiration augmente de 1 à 2,2 et de 1 à 1,7 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ respectivement pour le premier et le second pulse.

L'allure de la q_{O_2} suite à un pulse d'acide en carence azote montre les quatre phases distinctes, précédemment décrites pour la limitation glucose. Cependant la dynamique de la phase b est différente puisque pour la culture de référence, la phase b était constituée d'un plateau de respiration alors que dans ce cas précis la vitesse spécifique de consommation d'oxygène décroît de façon continue (Figure 40.B). Cette allure sera discutée dans le paragraphe II.2.4. Lors de la phase c correspondant à la re-accumulation des sucres de réserves, nous observons un pic de la vitesse spécifique de respiration puis un retour à la valeur initiale.

Pendant la culture et notamment durant les pulses, le glucose résiduel reste à une valeur constante de 0,04 g.L⁻¹ attestant de la consommation totale du glucose apporté. L'éthanol et l'acétate ne sont jamais détectés au cours de la culture.

Le rapport final N/C calculé à partir des débits de glucose et de l'azote apportés dans le réacteur est de 0,15 mol.Cmol⁻¹ alors qu'en condition d'une seule limitation carbone, ce rapport est de 0,2 mol.Cmol⁻¹. Cette valeur confirme l'arrêt des voies anaboliques en carence azote et l'accroissement de la biomasse totale dû à la seule accumulation des sucres de réserves durant cette phase.

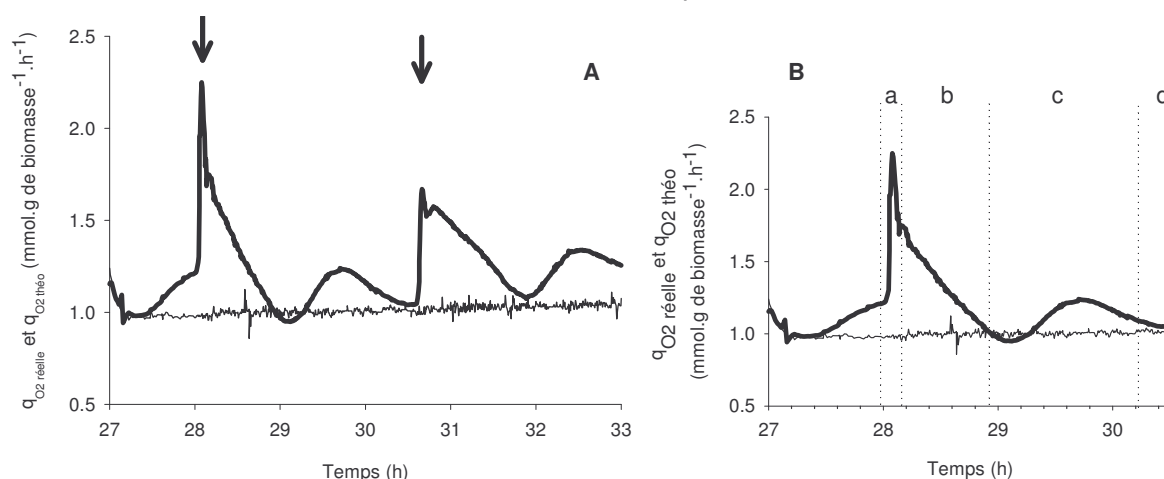


Figure 40 : Evolution des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène théorique (—) et réelle (—) suite à deux pulses d'acide propionique indiqués par des flèches en condition de carence azotée. A : réponse aux deux pulses d'acide propionique. B : Différentes phases de la respiration suite au premier pulse d'acide propionique.

Le coefficient respiratoire pendant la phase de carence est à une valeur voisine de 1,15, valeur suggérant que le carbone, en plus de la synthèse des sucres de réserves, se dirige vers la synthèse de lipides, composés plus réduits que la biomasse. Suite aux deux pulses, le coefficient respiratoire affiche une diminution importante, de la valeur de 1,15 il diminue à 0,9 simultanément au pulse. Cette forte diminution du coefficient respiratoire peut s'expliquer comme pour la culture de référence par une rétention partielle du CO_2 dans la cellule. Le QR reste à une valeur de 1,05 pendant 40 min puis remonte progressivement pour se stabiliser à sa valeur précédant le pulse en une heure (Figure 41). L'évolution du QR pendant la phase b s'explique par la consommation de l'acide propionique qui est un composé plus réduit que le glucose (degré de réduction de 4,67). Lors des expérimentations précédentes, la consommation de l'acide n'avait qu'un impact réduit mais signalé sur le QR. Ici, l'amplitude de cette répercussion peut être expliquée par le fait que l'acide propionique représente 16 % du carbone consommé alors qu'en seule limitation carbone (culture de référence), l'acide représente moins de 4 % du carbone consommé.

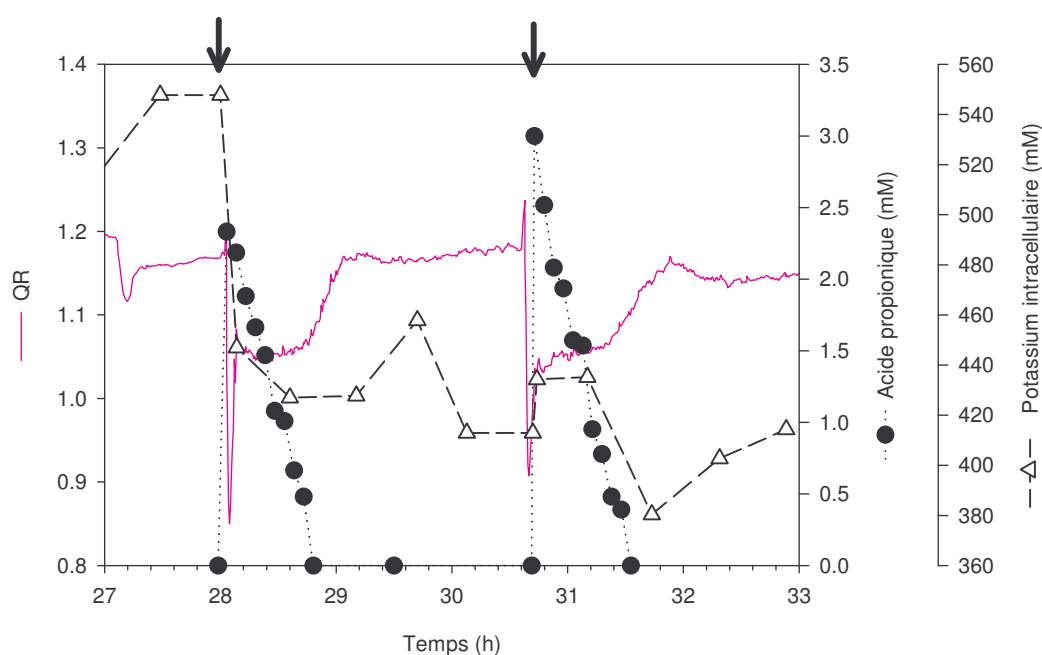


Figure 41 : Evolution du coefficient respiratoire, de la concentration exocellulaire en acide propionique et de la concentration intracellulaire en potassium suite à deux pulses d'acide propionique indiqués par les flèches, en condition de carence azotée.

II.2.2. Acide propionique

Pour les deux pulses, seuls 40 % de l'acide propionique initialement injecté sont retrouvés instantanément dans les surnageants de culture. Ensuite, la concentration en acide propionique diminue progressivement dans le milieu en 0,75 h et 0,83 h respectivement pour le premier et le second pulse (Figure 41). Il est dégradé avec la même vitesse spécifique que lors des cultures en seule limitation glucose

(respectivement 0,115 et 0,107 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ pour le premier et le second pulse). Un état physiologique correspondant à une carence azote, c'est à dire à un arrêt des voies anaboliques, n'inhibe ou n'interdit pas la dégradation de l'acide propionique. L'évolution du QR confirme donc la possibilité d'un catabolisme de l'acide propionique en condition limitante de source carbonée.

Dans le tableau 21 sont présentées les valeurs de concentrations intracellulaires en acide, du facteur d'accumulation et du pH_i suite aux deux pulses. Ces valeurs sont identiques entre la culture de référence et cette culture en carence azote. Le pH_i étant à une valeur similaire à la limitation glucose nous laisse penser que la levure en métabolisme carencé en azote régule son pH_i dans une gamme physiologique couramment admise. La dépense énergétique associée à l'augmentation de respiration et à la teneur intracellulaire en acide ($Y_{ATP, acide}^*$) est identique à celle obtenue pour la culture de référence (respectivement 4,2 et 3,6 moles d'ATP.mole d'acide⁻¹ pour les deux pulses). Nous pouvons aussi remarquer que cette dépense énergétique est légèrement inférieure au second pulse.

Tableau 21 : Concentrations en acide intracellulaire, facteurs d'accumulation, pH_i et $Y_{ATP, acide}^*$ suite aux deux pulses d'acide propionique de 6,7 mM en carence azotée.

Pulse	A _{in} (mM)	F	pH _i	$Y_{ATP, acide}^*$
1 ^{er}	77	33	6,8	4,6
Second	66	22	6,7	3,3

II.2.3. Cations intracellulaires

Etonnamment, les teneurs intracellulaires en potassium et en magnésium en phase d'accumulation de réserves sont fortement élevées (550 mM et 66 mM) par rapport à une culture oxydative en seule limitation carbone (280 mM et 48 mM) ; cette observation n'a jamais été rapportée dans la littérature.

Suite au premier pulse d'acide, la concentration intracellulaire en K⁺ diminue fortement à une valeur de 430mM (Figure 41). Cette concentration reste constante pendant une heure puis réaugmente brusquement à la valeur de 460 mM. Cette soudaine augmentation correspond au pic de respiration de la phase c. Suite au second pulse, la teneur en K⁺ réaugmente légèrement pour atteindre une valeur voisine du plateau précédemment estimée (460 mM) avant de décroître 30 minutes jusqu'à une valeur de 380 mM. Commence ensuite une phase d'accumulation sans que, néanmoins, la concentration initiale de 550 mM ne soit retrouvée.

La concentration intracellulaire en Mg²⁺ ne varie que très peu suite aux pulses et reste toujours à une valeur voisine de 66 mM et la teneur en sodium intracellulaire ne fait que diminuer au cours de la culture similairement à notre culture de référence (non montré).

II.2.4. Réserves intracellulaires

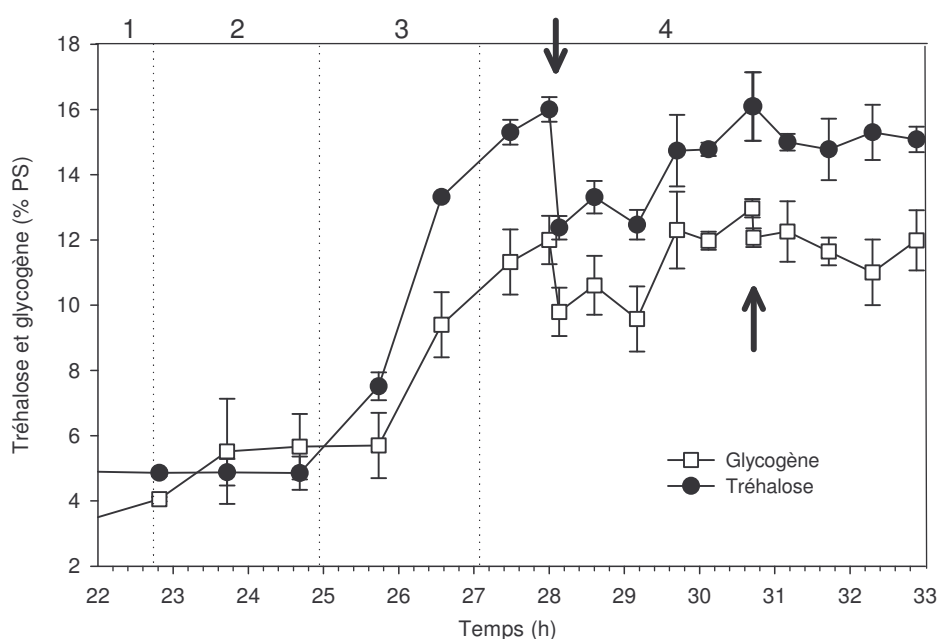


Figure 42 : Dynamique des teneurs intracellulaires en tréhalose et glycogène en condition de carence azote suite à deux pulses d'acide propionique. Les flèches indiquent les pulses d'acide.

Instantanément suite au pulse d'acide propionique (5 min), les carbohydrates sont dégradés ; le tréhalose voit sa concentration diminuer de 16 à 12,3 % PS et le glycogène de 12 à 9,8 % PS (Figure 42). Les sucres de réserves se maintiennent à ces taux pendant 1,5 h, puis débute, concomitamment à l'augmentation de la teneur en potassium, une phase de reconstruction jusqu'à atteindre les valeurs initiales en tréhalose et en glycogène.

Une plus faible dégradation des réserves, observée au second pulse peut expliquer la différence d'amplitude obtenue sur les vitesses de respiration.

La dynamique de dégradation des sucres de réserves, suite au pulse d'acide propionique, est différente entre les cultures de référence et celle-ci. En effet en conditions d'une seule limitation glucose, la dégradation des sucres de réserves est progressive et se poursuit durant une heure après le pulse tandis qu'elle est instantanée en carence azote. Cette différence peut alors expliquer la différence de profil de vitesse de respiration entre les deux cultures. En effet, l'excès de respiration observé dans notre culture de référence a été associé à un excédent de flux de carbone dû à la dégradation simultanée des réserves et de l'acide propionique. En carence azote, les réserves étant dégradées instantanément provoquent un excès de carbone oxydé dans les 5 premières minutes.

L'excès de respiration observé pendant la phase b pourrait être imputé à la dégradation de l'acide propionique si les vitesses moyennes sont comparées. En effet, la

vitesse de dégradation de l'acide propionique sur la phase est de $0,347 \text{ mCmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour une vitesse moyenne de production d' O_2 de $1,35 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Néanmoins, la vitesse de consommation de l'acide étant constante, la vitesse de respiration devrait être constante et un palier sur la q_{O_2} observé, ce qui n'est pas le cas. L'explication la plus plausible est alors une dissipation d'énergie non finalisée, donc un détournement net du flux carbone vers le catabolisme qui pourrait être mis en jeu pour lutter contre une pression de turgescence trop élevée. En effet durant cette phase, une quantité non négligeable de potassium est exportée (20 mM) correspondant à une réduction continue de la pression de turgescence et donc d'un besoin décroissant d'énergie. Ainsi durant cette phase, existerait bien un besoin énergétique lié à l'homéostasie osmotique. Ce phénomène n'est pas visible sur la culture de référence puisque durant la phase b un excédent de carbone était présent (sucres de réserves et acide propionique), ce qui laissait supposer que son oxydation résultait d'un overflow.

II.2.5. Capacité fermentaire de la levure

Pour la culture en carence azote, la capacité fermentaire hors ligne avant le pulse est de $0,82 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour le témoin, et de $0,6 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en présence d'acide propionique (Figure 43.). Les capacités fermentaires des deux tests sont plus élevées que pour la culture de référence ($0,75$ et $0,4 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour la culture de référence). Cet écart peut, selon nos conclusions partielles précédentes, être lié à la teneur basale en potassium beaucoup plus élevée. Suite au premier pulse, une légère surproduction d'éthanol est observée mais qui ne dure que 30 minutes, l'écart entre les deux tests n'est plus que de $0,18 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. En revanche suite au second pulse d'acide, une meilleure production est observée en présence d'acide ; elle est proche de $0,8 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et dure une heure, et l'écart entre les deux tests n'est plus que de $0,12 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Au bout de 33 heures de culture, la production, que ce soit pour le témoin et en présence d'acide chute pour atteindre les valeurs respectives de $0,66$ et $0,6 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. En carence azote, exactement comme en seule limitation carbone, l'« adaptation » n'est que transitoire ce qui implique un mécanisme commun de réponse entre des levures carencées en azote et des levures en limitation carbone. Cependant, il est intéressant de noter que lors du second pulse, l'adaptation dure plus longtemps que lors du premier (1 h 30 versus 1 h). Un fait précédemment remarqué et qui se trouve ici amplifié est une meilleure réponse pour le témoin pour les cellules ayant subi en mode oxydatif un ajout d'acide. Ce gain est relativement plus faible que celui quantifié pour le test en présence d'acide. La composition du milieu servant à effectuer le test est confidentielle, mais est à très forte pression osmotique, l'observation précédente nous conforte dans l'implication de la pression de turgescence dans le comportement cellulaire. Les cellules, dans la phase transitoire b afficheraient une pression de turgescence élevée qui, au niveau de la culture

induirait une dépense énergétique mais qui, pour le test fermentaire, l'adapterait favorablement au stress osmotique. Le maximum d'« adaptation » est obtenu à l'épuisement en acide propionique, instant pour lequel le maximum d'ions potassium est disponible pour leur rôle de neutralisation pour une seconde entrée d'acide. Ainsi, ce serait le décalage temporel existant entre la fonctionnalité de l'ion potassium et le niveau d'acidité intracellulaire qui fixerait la magnitude de l'adaptation.

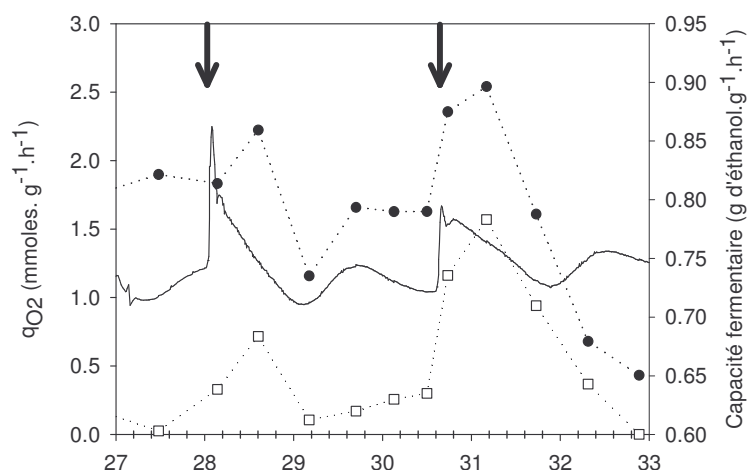


Figure 43 : Vitesse spécifique de respiration (—) et capacité fermentaire en absence (●) et en présence d'acide (□) pour la culture en carence azotée.

II.3. Discussion

II.3.1. L'énergie dissipée lors de la phase a est équivalente en condition de carence azotée et en seule limitation carbone

Lors de la phase a de la respiration, suite à l'ajout d'acide propionique, la levure en carence azotée régule son pH_i dans une gamme de pH physiologique admissible, exactement comme dans notre culture de référence. En dépit d'un métabolisme carencé, la levure trouve des ressources qui lui permettent de réguler son pH_i et donc de faire face à l'acide. La réponse instantanée à l'acide observée sur la vitesse de respiration provoque une augmentation de la consommation d'oxygène et le rendement supplémentaire associé est de 0,15 moles.g de biomasse⁻¹ par rapport à la consommation théorique calculée. Cette valeur est identique pour une culture en seule limitation glucose, ce qui laisse supposer que cette perte d'énergie est indépendante de l'état physiologique de la levure et du devenir initial du carbone (anabolisme ou synthèse de réserves).

II.3.2. La teneur initiale en sucres de réserves ne détermine pas l'amplitude de dégradation

Pendant la phase de dégradation des réserves (5 minutes en carence azotée et 1 heure en culture en seule limitation glucose), les quantités de réserves dégradées sont respectivement de 1,8 et 1 mCmol.g de biomasse⁻¹ soit environ deux fois plus de réserves dégradées en carence azote. La teneur initiale en sucres de réserves étant 3 fois plus élevée, par conséquent, la quantité de réserves consommée n'est pas directement liée aux teneurs initiales de tréhalose et de glycogène. Les réserves consommées sur les 5 premières minutes libèrent 1,15 Cmoles supplémentaires. Nous nous attendions à une bascule vers le métabolisme fermentaire comme décrit par Guillou (1996) et Poilpré (2002), or ce phénomène n'est jamais observé dans notre cas comme en témoigne l'absence d'éthanol dans le milieu de culture. L'analyse des acides organiques intracellulaires montre une accumulation de tous ces acides sauf du pyruvate (résultats non montrés) ce qui confirme la présence d'un flux supplémentaire de carbone. Comme nous l'avons vu précédemment, en phase d'accumulation de sucres de réserves, 65 % de l'énergie est non finalisée, il se pourrait qu'au moment du pulse acide, si il existe un besoin énergétique supplémentaire, il y ait une redistribution de l'énergie disponible sans pour autant dégrader les réserves.

Pendant cette phase, le fait surprenant est l'exportation du potassium qui était présent à une valeur très élevée (550 mM) lors de la phase de carence. Cette sortie instantanée peut être expliquée par une trop forte pression osmotique intracellulaire au moment de l'entrée de l'acide dans la cellule. En effet, la cellule au moment du pulse possède de fortes teneurs en sucres de réserves et en potassium, l'entrée de l'acide augmente significativement la pression osmotique de la levure (200 kPa selon la loi de Van't Hoff). Par conséquent, nous pouvons penser qu'afin de réguler sa pression osmotique suite à l'entrée d'acide, la cellule expulserait du potassium hors de la cellule et dégraderait les sucres de réserves. Or, si la cellule expulse du potassium, elle fait rentrer des protons, ce qui paraît contradictoire avec une régulation du pH_i mais qui semble être confirmé par un facteur d'accumulation relativement faible par rapport au facteur d'accumulation de la culture de référence et qui est concordant avec un delta pH plus faible. Ainsi dans ce cas, la levure ne peut plus réguler son pH_i à une valeur optimale, ce qui expliquerait la dépense énergétique de la phase b par dissipation de l'énergie ATPasique qui diminuerait au fur et à mesure que la concentration intracellulaire en acide diminuerait (en équilibre avec le milieu extérieur) et ce qui expliquerait l'allure de q_{O_2} .

II.3.3. Schéma identique de réponse à l'acide propionique

La phase b correspond à la phase de dégradation de l'acide propionique, une forte teneur initiale en carbohydrates n'influe pas sur la vitesse de dégradation de l'acide

propionique ; la vitesse spécifique est toujours de l'ordre de $0,100 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, valeur identique pour notre culture de référence.

La phase c comme en limitation glucose est basée sur la reconstruction des sucres de réserves à une valeur proche de celle précédant le pulse. L'allure particulière de la respiration décrite, différente de la culture de référence, correspond à une vitesse spécifique de respiration supérieure à celle théoriquement estimée. En considérant le mouvement du potassium (son entrée puis son expulsion), cela correspondrait à un équivalent de 80 mM échangés sur une heure donc à un transfert de 80 mM de protons correspondant à $0,12 \text{ mmol d'ATP.g de biomasse}^{-1}$. Or, pendant cette phase, l'excédent de respiration par rapport à la valeur théorique représente une génération d'ATP voisine de $0,19 \text{ mmoles d'ATP.g de biomasse}^{-1}$. Par conséquent, l'excédent de respiration peut être imputé aux mouvements de cations dans la cellule. La variation expérimentale de la q_{O_2} précédemment décrite comme provenant de la reconstitution des réserves n'est ici pas visible puisque la $q_{O_2} \text{ théorique}$ est calculée sur la base de cette voie de biosynthèse.

Lors du deuxième pulse, la dégradation des réserves est plus progressive que pour le premier, ce qui explique la dynamique de respiration légèrement différente de la phase b entre le premier et le second pulse.

La réponse globale de la levure à l'acide propionique, en conditions de limitation glucose ou de carence azote est identique en terme de dynamiques de respiration. La séquence des événements est légèrement différente puisque les réserves ne sont pas dégradées dans la même phase de respiration, phase b pour une seule limitation glucose et phase a en carence azotée. D'après nos résultats, le rôle de la dégradation des sucres de réserves serait plus certainement une régulation de la pression osmotique plutôt qu'un besoin d'une source d'énergie supplémentaire pour lutter contre les effets des acides.

II.3.4. Le tréhalose, agent protecteur ?

Chez *S. cerevisiae*, une forte corrélation entre le contenu intracellulaire en tréhalose et la résistance aux stress a été montrée pour différentes souches, dans différentes conditions de croissance et pour différents effecteurs (François et Parrou, 2001). Wiemkem (1990) décrit le tréhalose comme un agent protecteur de la levure, il propose même de restreindre la fonction du tréhalose à l'unique rôle d'agent protecteur dans la cellule. Dans cette hypothèse, en présence d'acide propionique, une meilleure capacité fermentaire par rapport à celle obtenue avec de faibles teneurs en sucres intracellulaires (culture de référence) pouvait être attendue. Nous observons une légère

différence entre des levures carencées en azote et des levures en seule limitation glucose, nous avons expliqué cette différence par des teneurs en potassium et en sucres de réserves plus élevées. Une explication est apportée par van Dijck et coll. (1995) qui suggèrent que l'initiation de la fermentation est associée à une rapide perte de la résistance acquise au stress et à une rapide mobilisation du tréhalose. Leurs études ont été menées sur la résistance à la congélation et à la chaleur ; ils confirment l'existence d'une corrélation entre le contenu intracellulaire en tréhalose et la résistance au stress mais uniquement en métabolisme oxydatif. Bien que des contenus intracellulaires élevés en tréhalose soient corrélés à une meilleure résistance au stress, l'initiation de la fermentation provoque la disparition de tous les facteurs requis pour la maintenance de la résistance au stress, même en présence de fortes quantités de tréhalose. Par conséquent, la rétention de fortes concentrations en tréhalose intracellulaires pendant la fermentation ne prévient pas la diminution de la capacité fermentaire. Ceci expliquerait dans notre cas, la faible différence en terme de capacité fermentaire observée pour des levures à fortes et à faibles teneurs en tréhalose lorsqu'elles sont mises en présence d'acide. Par conséquent, si le tréhalose participe au flux fermentaire, il n'est pas lié à un processus de résistance. La différence de la capacité fermentaire absolue entre les tests en seule limitation glucose ou en carence azotée n'est donc pas imputable au tréhalose mais probablement au contenu cationique.

III. Pulses d'acide propionique en métabolisme oxydo-réductif

Nous avons réalisé une culture en métabolisme mixte afin de comparer la réponse à un pulse d'acide propionique entre un métabolisme purement oxydatif et un métabolisme respiro-fermentaire. Pour la phase a de la respiration, la demande énergétique peut-être due à une dissipation futile d'énergie mais également à un découplage énergétique, c'est à dire à une acidification mitochondriale qui réduit le rendement de la phosphorylation oxydative. Durant la phase b, il peut également exister une respiration accélérée du fait même d'échanges de cations associés à des co-transports de protons et, de ce fait une altération du rendement P/O. Toutefois, l'hypothèse d'une respiration accrue uniquement due à l'oxydation d'un flux de carbone additionnel sans finalisation de l'énergie produite n'est pas à rejeter. En métabolisme respiro-fermentaire, la part de l'énergie résultant de la voie réductive est chimiquement couplée au flux glycolytique associée avec un rendement de 0,5 moles d'ATP pour une Cmole d'éthanol produite. Ainsi la demande énergétique sera facilement quantifiable par la production d'éthanol. En effet, dans la littérature, il est décrit que pour lutter contre l'effet de l'acide, en condition d'anaérobiose, la levure augmente sa production d'éthanol afin d'augmenter sa production d'énergie (Verduyn, 1990a ; 1990b). Pour réaliser cette culture, nous avons donc imposé une vitesse de consommation d'oxygène en limitant et en contrôlant le transfert d'oxygène dans un but de quantifier la part de l'énergie amenée par la production d'éthanol par rapport à l'énergie provenant de la respiration. Sur la base des résultats précédemment obtenus en oxydatif pur sur glucose seul, en considérant un $Y_{Acide, ATP}^*$ identique (4,18 moles d'ATP.mole d'acide incorporée⁻¹) et une quantité d'acide intracellulaire équivalente, la production d'éthanol théorique correspondante suite au pulse d'acide serait de 484 mCmol d'éthanol, quantité significativement mesurable.

III.1. Conduite de la culture

Les différentes phases de la culture sont présentées sur les figures 44 et 45. La première phase consiste en une croissance cellulaire en régime purement oxydatif. Puis, le métabolisme oxydo-réductif est imposé par une limitation en oxygène (pour un kLa de 600 h⁻¹ et une r_{O₂} fixée à une valeur proche de 2 moles.h⁻¹) jusqu'à l'obtention de 35 g.L⁻¹ de biomasse (Phase 2). L'objectif est d'obtenir un rapport entre la vitesse spécifique de respiration et la vitesse spécifique de production d'éthanol constant sans que l'accumulation d'éthanol ne conduise à un titre inhibiteur de la croissance (proche de 8 g.L⁻¹) sur une durée de 3 h. La simulation de ces contraintes impose une concentration cellulaire voisine de 35 g.L⁻¹ et un coefficient respiratoire de 1,3. Expérimentalement,

lorsque le QR a été stabilisé à cette valeur de consigne, un premier pulse d'acide propionique (7,3 mM) est effectué (Phase 3). Pendant cette phase, l'accroissement de la concentration en éthanol dans le milieu se poursuit. Dès que la concentration en éthanol atteint la valeur de 8 g.L^{-1} , le flux de glucose est diminué pour que commence une phase de consommation de l'éthanol accumulé (Phase 4). Dès que l'alcool n'est plus présent dans le milieu et que l'acide propionique est consommé, le débit de sucre est réajusté afin de reproduire les objectifs définis ci-dessus (Phase 5). Le second pulse (10,9 mM) est effectué pour une concentration cellulaire de 70 g.L^{-1} (Phase 6). Le taux de croissance au cours des phases 2 jusqu'à 6 diminue de $0,2 \text{ h}^{-1}$ à $0,04 \text{ h}^{-1}$ imposé par le débit constant de glucose et il est proche de celui imposé lors des cultures oxydatives.

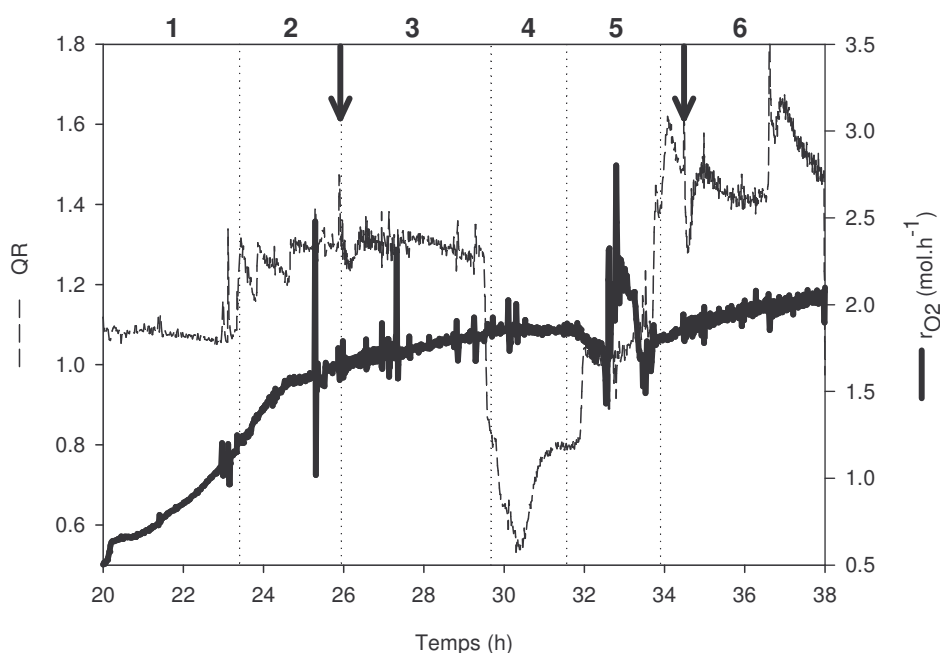


Figure 44 : Evolution du coefficient respiratoire et de la r_{O_2} pour la culture en métabolisme mixte selon les différentes phases de la culture. Les pulses d'acide sont indiqués par les flèches.

III.2. Résultats

Dès que le métabolisme réductif prend place, nous avons observé une légère production d'acide succinique ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$), en revanche, le glycérol et l'acide pyruvique ne sont pas détectés. La présence d'acide propionique ne provoque aucune variation concernant ces métabolites. Pour la phase de production et celle qui suit le pulse d'acide propionique (Phases 2 et 3), les rendements en biomasse et en éthanol par rapport au substrat restent identiques en dépit de la présence d'acide propionique (Tableau 22). Le volume cellulaire, mesuré pour différentes phases de la culture est voisin de $1,5 \text{ mL.g}$ de biomasse $^{-1}$, cette valeur est identique à celles obtenues en cultures oxydatives.

Tableau 22 : Valeurs des rendements bruts de conversion du substrat pour un métabolisme respiro-fermentaire en phase de production d'éthanol (phase 2) et après un pulse d'acide propionique (phase 3).

Rendement	Phase 2	Phase 3
R_{SX}	0,46	0,48
$R_{S\text{éthanol}}$	0,13	0,12
R_{SCO_2}	0,39	0,43

Les rendements sont exprimés en $\text{Cmol.Cmol de glucose}^{-1}$.

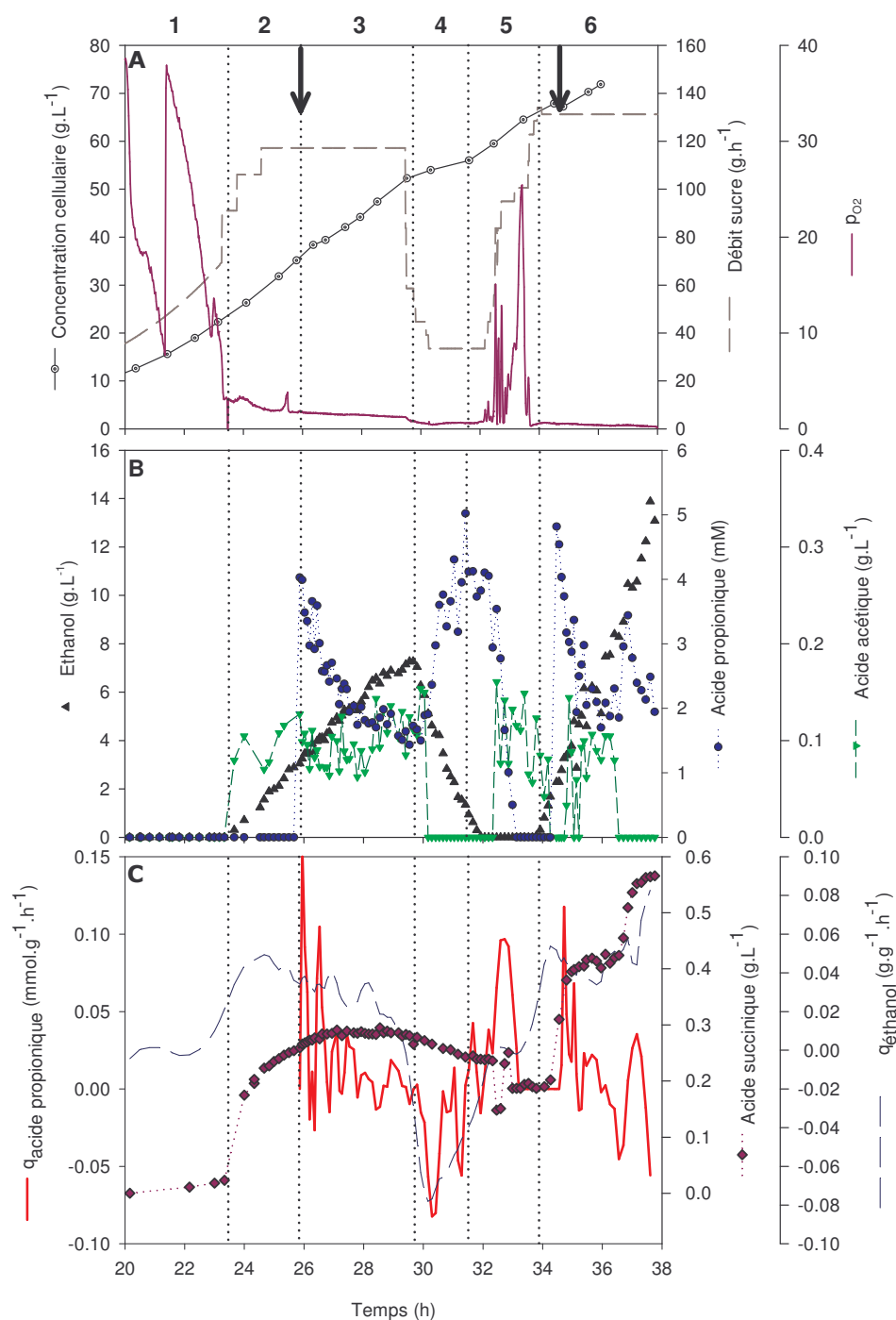


Figure 45 : Caractérisation de la réponse biologique à deux pulses d'acide propionique en métabolisme oxydo-réductif, à pH 5. Avec en A : conduite de la culture, B : co-métabolites et acide propionique, C : vitesses spécifiques et concentration en acide succinique. Les pulses d'acide sont indiqués par les flèches.

III.2.1. Acide propionique et co-métabolites

Les conditions de cette culture étant différentes de celles réalisées jusqu'à présent (notamment en terme concentration cellulaire et de volume liquide), la quantité d'acide à injecter a été recalculée à partir d'une équation bilan sur l'acide qui tient compte du facteur d'accumulation intracellulaire (F) et d'une approximation du volume occupé par la biomasse ($2.X.V_{\text{total}}$) :

$$\text{Quantité à injecter} = (V_{\text{total}} - \frac{2X.V_{\text{total}}}{\rho}) \times A_{\text{exo}} + \frac{X.V_{\text{total}} \cdot A_{\text{exo}} \cdot F}{\rho} \quad \text{Equation 50}$$

Avec V_{total} : volume liquide + volume occupé par les cellules.

Cette équation suppose que suite au pulse d'acide dans le réacteur, la concentration en acide exocellulaire et le facteur d'accumulation sont identiques entre cette culture et la culture de référence. Cela a permis de calculer la quantité d'acide à injecter pour des concentrations cellulaires de 35 et 70 g.L⁻¹ respectivement pour les 2 pulses d'acide propionique.

Pour les deux pulses réalisés, respectivement à 25,9 h et 34,5 h, quantifiés par cette méthode de calcul, la concentration intracellulaire en acide est identique. Le facteur d'accumulation est légèrement plus faible qu'en oxydatif pur et par conséquent, le pH_i est légèrement plus bas mais reste proche des conditions physiologiques admissibles (Tableau 23).

Tableau 23 : Concentrations d'acide propionique injectées, intracellulaires, facteurs d'accumulation et pH intracellulaires en condition de limitation d'oxygène.

Pulse	A _{injecté} (mM)	A _{in} (mM)	F	pH _i
1 ^{er}	7,9	84	21	6,6
Second	12,7	87	18	6,5

En ce qui concerne les dynamiques des différents métabolites, suite au pulse, nous remarquons que la concentration en acide acétique ne varie pas et reste à une valeur proche de 100 mg.L⁻¹, que la vitesse spécifique de production d'éthanol reste proche d'une valeur de 0,05 g.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ et que le coefficient respiratoire ne varie pas (Figure 45.B. et C.). En revanche, le pulse d'acide correspond à l'arrêt de la production d'acide succinique qui se stabilise à une concentration de 0,3 g.L⁻¹. L'acide propionique disparaît progressivement du milieu avec une vitesse spécifique moyenne de 0,006 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ (Figure 45.C. phase 2), cette vitesse est très inférieure à la vitesse de consommation observée en régime oxydatif pur (0,100 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹).

La phase 4 correspond à la consommation de l'éthanol et à l'épuisement immédiat de l'acide acétique, précédemment accumulés. Cette phase débute alors que la totalité de l'acide propionique n'est pas incorporée intracellulairement (concentration exocellulaire de 1,5 mM) et est caractérisée par un coefficient respiratoire proche de 0,5. Durant cette période, la concentration en glucose résiduel qui, depuis le début de la culture, était à une valeur constante de 30 mg.L⁻¹ passe à une valeur non détectable. L'acide succinique est légèrement consommé mais se maintient cependant à une valeur de 0,2 g.L⁻¹. La totalité de l'acide acétique est épuisée avant l'éthanol, et dès l'épuisement en acide acétique, nous observons une diffusion de l'acide propionique vers

le milieu extérieur. La concentration maximale exocellulaire obtenue, de 51 mM (supérieure à celle instantanément obtenue après l'injection d'acide), est atteinte à la déplétion totale en éthanol. Dès cet instant, l'acide propionique est dégradé et la vitesse spécifique de consommation augmente pour atteindre un maximum de 0,120 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ (Figure 45.C.). Pendant cette phase de consommation de l'acide propionique, l'acide acétique est excrété dans le milieu à une concentration proche de 0,12 g.L⁻¹. L'acide propionique est totalement épuisé du milieu en 1,7 h. Durant cette phase, le flux d'alimentation en glucose a été continûment augmenté afin de maintenir un régime purement oxydatif sur la base d'une consigne en oxygène dissous proche de zéro (Figure 45.A.). Pour ces conditions opératoires analogues à celles imposées lors de la culture de référence, cette phase reproduit l'équivalent d'un ajout exogène d'acide propionique sur des cellules préalablement exposées à l'acide et dont on peut supposer que l'acquis cellulaire dépend uniquement de la présence de l'acide indépendamment de sa consommation.

Les conditions opératoires de la phase 6 ont permis de rétablir un mode respiro-fermentaire avec une vitesse spécifique de production d'éthanol proche de 0,06 g.g de biomasse⁻¹.h⁻¹, identique à celle observée dans la phase 2. Comme pour le premier ajout, le second pulse n'influe pas sur la vitesse de production d'éthanol ni sur celle de l'acide acétique (Phase 6). En revanche, nous pouvons observer un arrêt de production d'acide succinique. La vitesse moyenne de dissimilation de l'acide propionique est 4 fois supérieure à celle obtenue pour le premier pulse (0,026 mmol.g⁻¹.h⁻¹). Comme pour le premier pulse, la totalité de l'acide n'est pas incorporé intracellulairement ; la concentration exocellulaire en acide restante est de 2 mM.

III.2.2. Cations intracellulaires

Les teneurs en potassium et magnésium sont légèrement inférieures à celles obtenues en régime purement oxydatif (200 mM contre 280 mM pour le potassium et 30 mM versus 48 mM pour le magnésium, Figure 46.B.). Suite au pulse d'acide propionique, la teneur en potassium croît continûment durant toute la phase d'incorporation de l'acide propionique et, avec une cinétique plus faible durant le catabolisme de l'éthanol pour atteindre une valeur maximale de 340 mM. Malgré l'épuisement en acide propionique, sa concentration ne diminue que faiblement (320 mM) et elle se re-stabilise à sa valeur maximale précédente lors du second ajout en phase 6. Le magnésium accumulé durant la phase d'importation de l'acide propionique jusqu'à une concentration de 35 mM est expulsé en début de co-métabolisation de l'acide acétique et de l'éthanol. Comme pour la culture de référence, une importante accumulation (50 mM) intervient dans la phase de consommation oxydative de l'acide propionique. Lors de la phase oxydo-réductive (Phase

6) et du deuxième pulse d'acide, les concentrations intracellulaires en magnésium et potassium ne varient pas. La concentration en sodium diminue tout au long de la culture (résultat non montré).

III.2.3. Réserves intracellulaires

Les teneurs intracellulaires en carbohydrates sont connues pour être dépendantes des conditions de culture : taux de croissance, présence d'oxygène ou non et carences nutritionnelles (Kuenzi et Fiechter, 1992 ; Lillie et Pringle, 1980). En métabolisme mixte ou fermentaire, les concentrations en carbohydrates sont plus faibles qu'en mode oxydatif pur. Ainsi, en complète anaérobiose, pour des taux de croissance compris entre 0,05 et 0,1 h⁻¹, les teneurs en tréhalose sont comprises entre 0,3 et 0,6 % PS (Arneborg et coll., 1995). Les faibles teneurs attendues et donc la réserve énergétique potentielle associée devraient nous éclairer sur leur implication dans la réponse à un stress acide telle que nous l'avons jusqu'à présent analysée. Dans notre culture caractérisée par un taux de croissance de 0,2 h⁻¹, les teneurs initiales en tréhalose et glycogène sont respectivement de 1 et 3,4 % PS (Figure 46.C.). Par rapport à un régime oxydatif pur, la teneur en tréhalose est plus faible (5 % PS en oxydatif à un taux de croissance de 0,1 h⁻¹) alors que la teneur en glycogène est similaire (4 % PS en oxydatif à un taux de croissance de 0,1 h⁻¹).

Le pulse d'acide propionique ne provoque pas de dégradation instantanée des sucres de réserves contrairement à ce que nous avons observé en culture oxydative. Cependant, 1 heure après le pulse débute une phase lente de dégradation du glycogène. Sa concentration diminue de 3,2 à 1,4 % PS durant toute la phase de dissimilation de l'acide alors que la concentration en tréhalose ne varie pas pendant toute cette phase.

Lors de la phase 4 correspondant au co-métabolisme oxydatif éthanol-glucose, nous observons une construction de tréhalose et de glycogène pour atteindre au bout de 4 heures les concentrations respectives de 3,5 et 2,5 % PS, évolution en accord avec les résultats obtenus pour un catabolisme sur glucose seul.

La diminution brusque du glycogène à 32,5 h de culture pourrait correspondre à la phase de consommation de l'acide propionique qui survient après complète déplétion de l'éthanol exocellulaire ou à un changement de métabolisme qui devient oxydatif uniquement sur glucose. Cette phase (pouvant être assimilée à un ajout exogène d'acide, cf. § III.2.1.) n'altère pas la dynamique de reconstitution du pool en tréhalose. Cette observation infirme l'hypothèse de l'implication des sucres de réserves dans une réponse à un stress acide en métabolisme oxydatif pur.

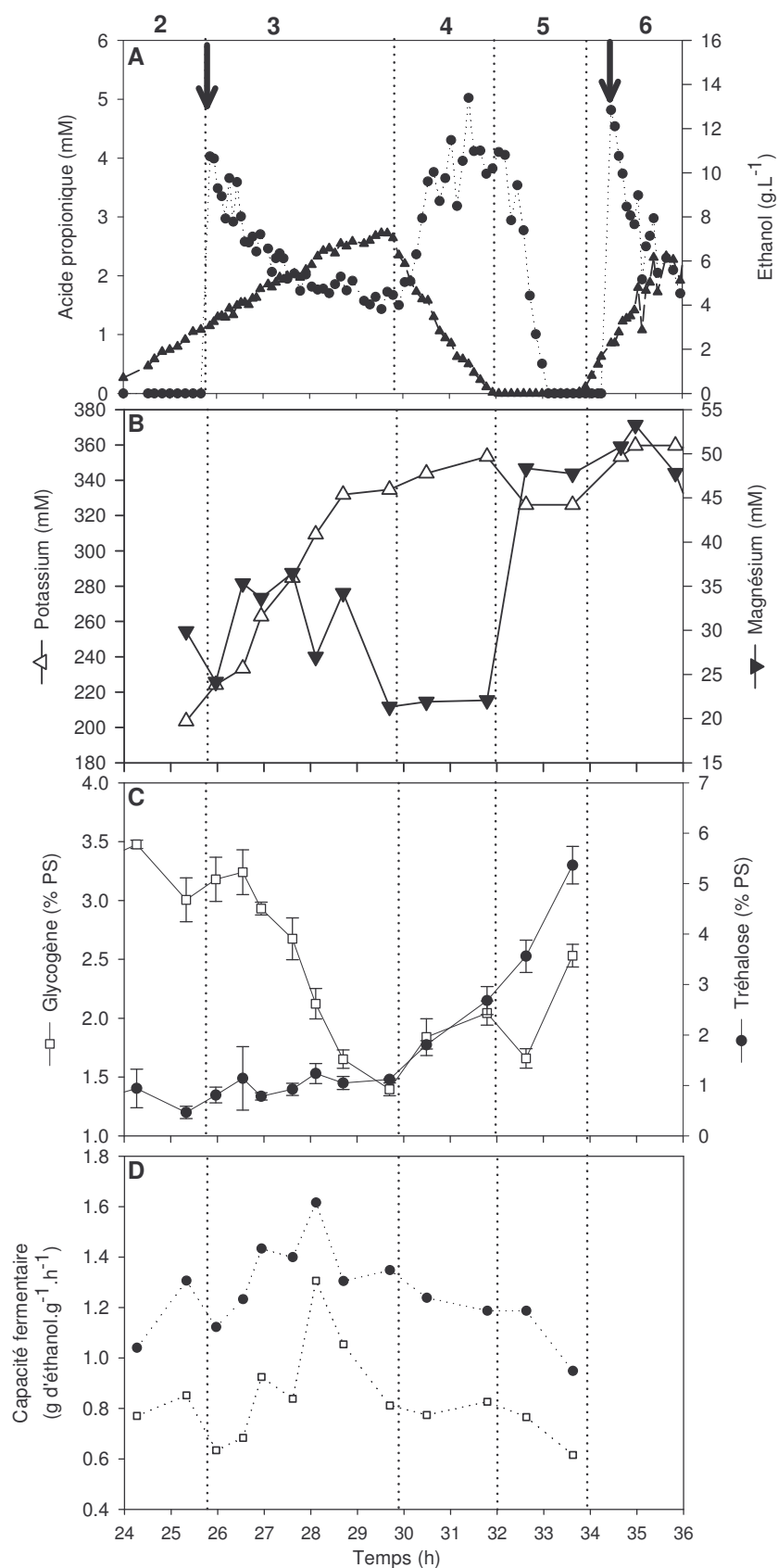


Figure 46 : Evolution des variables pour une culture en métabolisme oxydo-réductif. A : Concentrations en acide propionique et en éthanol exocellulaires. B : Potassium et magnésium intracellulaires. C : Teneurs en tréhalose et glycogène. D : Capacité fermentaire hors ligne en absence (●) et en présence d'acide propionique (□).

III.2.4. Capacité fermentaire

Notre objectif était non seulement de déterminer le potentiel intrinsèque de production d'éthanol de levures obtenues selon un métabolisme oxydo-réductif contrôlé par la vitesse d'oxydation de la source carbonée mais aussi de comparer l'impact de deux métabolismes énergétiques distincts sur la capacité fermentaire suite à un stress acide.

La capacité fermentaire hors ligne avant le pulse est de $1,1 \text{ g d'éthanol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour le témoin et de $0,8 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en présence d'acide propionique (Figure 46.D.). Ces valeurs sont plus élevées qu'en métabolisme purement oxydatif sur glucose seul ($0,75$ et $0,4 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement) et pourraient être liées à l'activité déjà mise en place de la voie fermentaire associée à toutes les voies de régulation et d'homéostasie inhérentes à ce métabolisme. Ceci est confirmé par une réduction très nette de la capacité fermentaire du témoin lorsque un métabolisme oxydatif sur glucose est restauré à 33,5 h de culture. La réduction absolue de la capacité liée à la présence d'acide est identique pour les deux métabolismes énergétiques, ce qui laisse supposer un mécanisme similaire dans l'établissement de la phase de latence telle qu'elle a été décrite dans le § IV.2.1. (Chapitre II, Résultats). Suite au pulse d'acide propionique dans le réacteur, les capacités fermentaires du témoin et en présence d'acide diminuent puis s'accroissent pendant 3 heures pour atteindre les valeurs de $1,6$ et $1,3 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement pour le témoin et l'essai test. Cette phase correspond dans le fermenteur à la phase d'entrée de l'acide ; la plus forte capacité fermentaire est atteinte lorsque la concentration intracellulaire en acide atteint un maximum. Commence ensuite une phase de diminution de la capacité fermentaire que ce soit pour le témoin ou en présence d'acide (Phases 4 et 5). Nous observons tout au long de cette culture que l'écart de capacité fermentaire entre le témoin et le test en présence d'acide reste constant à une valeur proche de $0,3 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, nous pouvons donc en conclure qu'il n'y a pas d'« adaptation », au sens où nous l'avons définie pour les cultures en mode oxydatif.

III.3. Discussion

III.3.1.a. Non dégradation et extrusion de l'acide propionique

L'acide propionique introduit dans une culture en métabolisme mixte pénètre instantanément à l'intérieur de la levure par diffusion passive avec un facteur d'accumulation légèrement plus faible qu'en régime oxydatif, ce qui correspondrait à un pH_i instantané nettement inférieur à la culture de référence. Ainsi, pour la régulation immédiate du pH_i , une disponibilité énergétique semble nécessaire qui est réalisable en oxydatif avec une capacité respiratoire supérieure à la q_{O_2} imposée (Guillou, 1996) par une activité ATPasique rapide. Cette régulation est impossible dans nos conditions de métabolisme mixte suite à des limitations en oxygène et en substrat carboné. Ce

phénomène confirme le cycle futile précédemment discuté, qui n'est pas visible sur la production d'éthanol car dans ce cas, une surproduction impliquerait une redistribution des flux carbone qui apparemment ne peut pas se mettre en place instantanément.

L'entrée de l'acide est identique (80 mM) en métabolisme mixte à celle obtenue suite à un stress en métabolisme oxydatif. Cependant, l'entrée de potassium est moindre (20 mM) et ne correspond pas à la neutralisation totale de l'acide intracellulaire pour un pH physiologique optimum.

Le fait majeur est la non consommation de l'acide propionique en métabolisme respiro-fermentaire démontrée par trois phénomènes : la stabilisation de la concentration exocellulaire, l'exportation de l'acide lorsque le co-métabolisme oxydatif sur éthanol et sur glucose est mis en place, et sa consommation vérifiée en métabolisme oxydatif sur glucose.

D'après nos résultats, l'acide propionique ne peut être catabolisé qu'en métabolisme oxydatif sur glucose seul avec des niveaux extracellulaires en acide acétique faibles, ce qui corrobore les résultats de van den Berg et coll. (1996). En effet, la première enzyme de la voie de dégradation de l'acide propionique est l'acétyl-CoA synthase, qui active l'acide propionique en propionyl-CoA (Pronk et coll., 1994, figure 47).

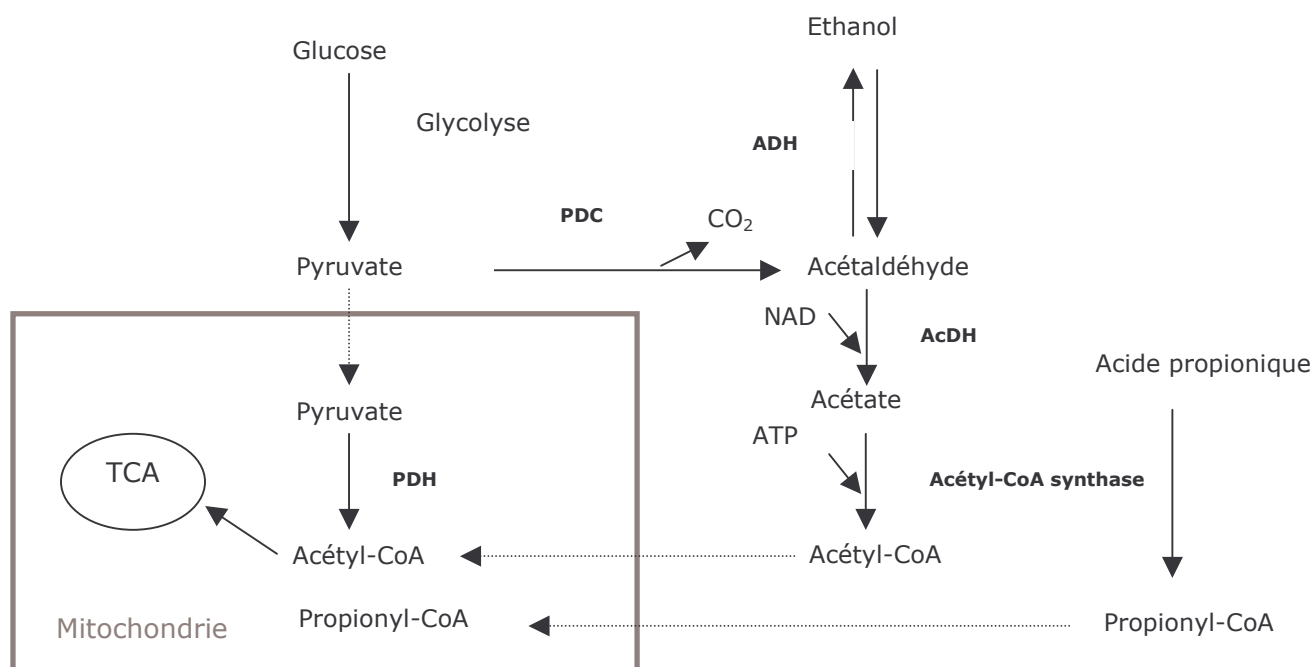


Figure 47 : By-pass de la pyruvate déshydrogénase (PDH). Cette voie métabolique permet de contourner la PDH et de produire de l'acétyl-CoA cytosolique. L'acide propionique est activé en propionyl-CoA par l'acétyl-CoA synthase. PDC : pyruvate décarboxylase, ADH : alcool déshydrogénase, AcDH : acétaldéhyde déshydrogénase, PDH : pyruvate déshydrogénase.

S. cerevisiae possède deux gènes *ACS1* et *ACS2* codant chacun pour une acétyl-CoA synthase, qui sont deux isoenzymes essentielles pour l'activité cellulaire et qui ont des propriétés catalytiques et des spécificités de substrats différentes (van den Berg et coll., 1996). Néanmoins, leur fonction principale reste la transformation de l'acide acétique en acétyl-CoA. Des conditions différentes induisent l'expression de ces deux gènes, ainsi, ils sont tous les deux exprimés lors de croissances limitées par la source de carbone sur glucose, éthanol ou acide acétique. Les différences principales entre ces deux isoenzymes résident dans le fait que le gène *ACS1* est réprimé par la présence de glucose et d'éthanol dans le milieu de culture et que seule la protéine Acs1p est capable d'utiliser l'acide propionique comme substrat (van den Berg et coll., 1996). Cette répression sélective du gène *ACS1* explique pourquoi, dans nos conditions nous n'observons pas de dégradation de l'acide propionique ni dans la phase d'accumulation d'éthanol ni dans celle de sa consommation oxydative alors que l'acide acétique est rapidement épuisé durant cette dernière. Par conséquent, dès que l'éthanol est épuisé, l'acide propionique peut être dégradé à la même vitesse que dans la culture de référence, ce qui est en accord avec les résultats de van den Berg et coll. (1996) qui montrent que les niveaux d'expression du gène *ACS1* augmentent en absence d'éthanol.

L'acide propionique n'est pas consommé en condition respiro-fermentaire, cependant, une entrée progressive de l'acide dans la cellule est observée pendant la phase de production d'éthanol. Le mécanisme de régulation du pH_i qui est réalisé par l'entrée du potassium, associée à l'export de protons implique cette entrée d'acide progressive. En effet, le potassium entrant dans la cellule, neutralise l'acide propionique et déplace l'équilibre dans le sens de l'entrée de l'acide. Ainsi, le facteur d'accumulation de l'acide et le pH_i augmentent pour se stabiliser à 27,5 h de culture (Figure 48). Nous pouvons remarquer que le pH_i et F se stabilisent alors que la concentration en acide exocellulaire continue de diminuer. Cette baisse de la concentration peut être associée à l'effet de dilution de la biomasse due à une croissance continue dans le réacteur. Néanmoins, nous observons un arrêt de l'entrée de l'acide et du potassium dans la cellule lorsque la concentration intracellulaire en potassium atteint la valeur de 360 mM. A cet arrêt correspondent un facteur d'accumulation de 60 et un pH_i de 7. Le pH atteint à ce moment précis est plus élevé qu'au moment du pulse dans cette culture ou pour les cultures en mode oxydatif et correspond à un pH physiologique optimal.

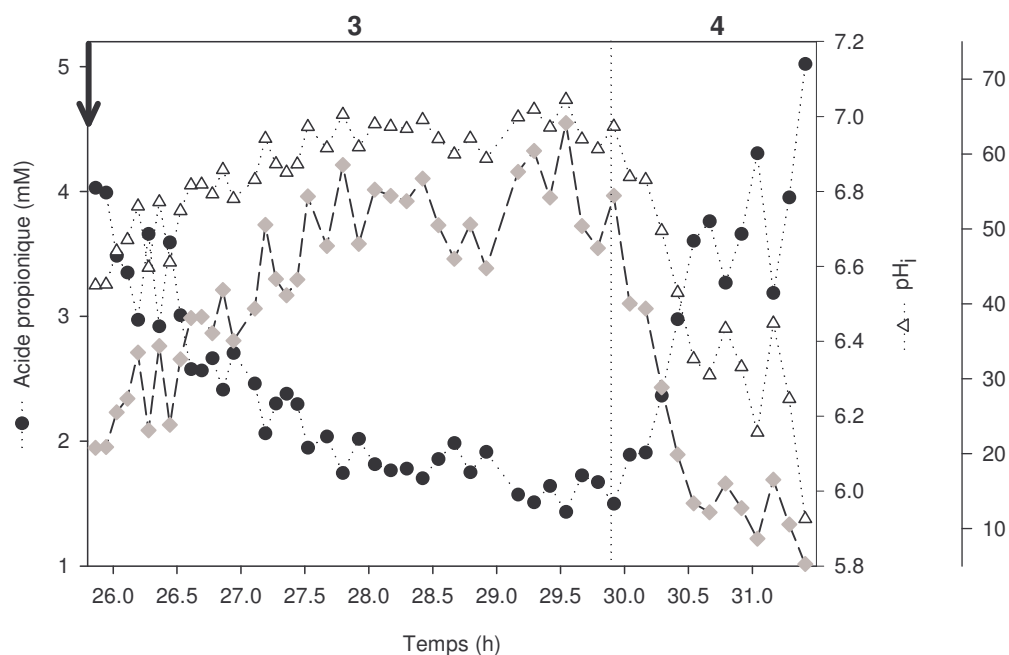


Figure 48 : Dynamique de la concentration en acide propionique exocellulaire, du pH_i et du facteur d'accumulation sur les phases 3 et 4 de la culture en métabolisme mixte. La flèche indique le pulse d'acide propionique.

L'élément surprenant est l'exportation immédiate d'une fraction de l'acide propionique lorsque est imposé un régime oxydatif en co-catabolisme éthanol et glucose. Cependant, en absence d'un flux net de transport de potassium, ce phénomène ne peut être attribué à un déplacement d'équilibre lié à un transfert de cations. La sortie de la forme anionique de l'acide est largement discutée dans la littérature, elle a tout d'abord été observée chez *Z. bailii* par Warth (1977). Il montre que l'acide benzoïque est extrudé par *Z. bailii* mais ce phénomène n'est pas observé pour *S. cerevisiae* ; ce qui est alors défini comme le mécanisme premier de la résistance aux acides faibles de *Z. bailii*. Plus récemment, Cole et Keenan (1987) suggèrent que l'extrusion d'acide benzoïque observée chez *Z. bailii* est due à une diminution du pH_i qui alors provoque un changement dans l'équilibre de l'acide de part et d'autre de la membrane plasmique. Cependant, toutes les expériences précédemment discutées sont réalisées sur des cultures en début de phase stationnaire de croissance, mises en présence d'acide benzoïque avant l'ajout d'une source de carbone (glucose). Ces mêmes observations ont finalement été obtenues pour *S. cerevisiae* par Henriques et coll. (1997) qui observent que l'acide benzoïque est extrudé suite à un pulse de glucose sur des cellules en phase stationnaire de croissance qui ont déjà été exposées à ce même acide. Cependant, en présence d'un inhibiteur de l' H^+ -ATPase (le diethylstilbestrol), cette expulsion n'est pas observée, ce qui tendrait à montrer que cette extrusion n'est possible qu'en présence d'une source d'énergie disponible pour la levure. Dans la littérature, l'exportation de la forme anionique est

décrite comme étant réalisée par une protéine membranaire ATP-dépendante Pdr12p (Piper et coll., 1998, cf. § II.3.3.a. Etude bibliographique).

Dans notre cas, lors de la phase oxydative sur glucose et éthanol (phase 4), nous observons un coefficient respiratoire faible (QR de 0,5) et un déficit de 20 % dans les bilans carbone et redox. Ce déficit peut être imputé en partie au CO_2 et il semblerait qu'il soit retenu intracellulairement ce qui provoquerait une acidification cytosolique. A cette diminution du pH_i , par les équilibres de part et d'autre de la membrane plasmique, nous pouvons associer l'export de l'acide propionique.

Pour vérifier cette hypothèse, en fin de culture (à 36,6 h), nous avons réalisé un pulse d'acide acétique de concentration finale de $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ (Figure 49). La totalité de l'acide entre instantanément dans la cellule par diffusion passive, et n'est pas détecté dans le milieu de culture. Simultanément nous observons une extrusion de l'acide propionique dont la concentration augmente dans le milieu extérieur de 2 mM à 3,5 mM. La consommation de l'acide acétique se traduit par la diffusion de l'acide propionique vers le milieu exocellulaire. Ainsi, nous pouvons en déduire que la diffusion intracellulaire d'un acide provoque l'acidification cytosolique et l'extrusion immédiate de l'acide propionique, ce qui valide notre hypothèse, lors du changement de métabolisme (phase 4) de la rétention intracellulaire du CO_2 .

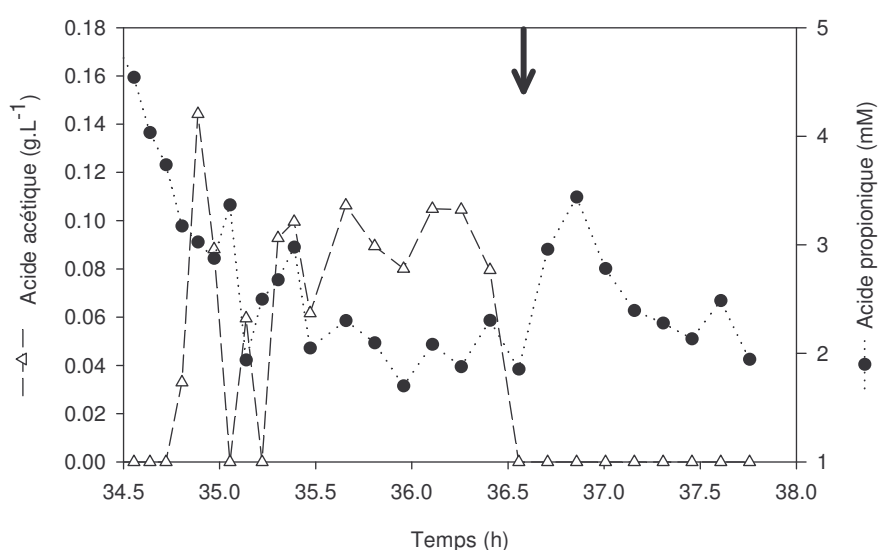


Figure 49 : Dynamique des concentrations exocellulaires en acide acétique et en acide propionique suite au deuxième pulse d'acide propionique en métabolisme mixte. La flèche indique le pulse d'acide acétique réalisé en fin de culture.

III.3.1.b. L'énergétique en métabolisme respiration-fermentaire

Différentes études montrent qu'en métabolisme purement fermentaire, pour des cultures continues, des ajouts d'acides acétique ou propionique dans le milieu d'alimentation provoquent une augmentation de la production d'éthanol, sans modifier la

production de glycérol et en diminuant le rendement de conversion du substrat en biomasse (Verduyn, 1990a ; 1990b, Arneborg et coll., 1995). Ainsi, Arneborg et coll. (1995) observent qu'à un taux de croissance de $0,1 \text{ h}^{-1}$, la présence de 33 mM d'acide acétique augmente le rendement en éthanol de 37 %. L'addition d'acide provoque une augmentation de la production d'éthanol proportionnelle à la demande d'énergie sous forme ATP correspondant à une fraction de substrat indisponible pour la production de biomasse ou pour les voies anaboliques.

Dans nos conditions, nous n'observons aucune augmentation de la production d'éthanol et le rendement en biomasse reste identique. Comme discuté ci-dessus, la vitesse de respiration imposée n'autorise pas une surproduction d'énergie oxydative instantanée et le maintien d'un flux réductif constant ne plaide pas pour une dissipation d'énergie couplée à la voie fermentaire. Toutefois, la dégradation lente des réserves en glycogène peut faire penser à un flux de carbone complémentaire, et sûrement à une modification de la composition macromoléculaire de la biomasse. Ainsi, par la simple redistribution du carbone dans les différentes voies anaboliques, même en absence d'une augmentation de la vitesse nette de génération d'énergie, une réduction de la demande énergétique anabolique peut générer un excédent nécessaire au rétablissement très progressif de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, en métabolisme purement oxydatif, la capacité de générer très rapidement par la phosphorylation oxydative l'énergie nécessaire, permettrait la régulation dynamique du pH_i par une activité ATPasique corrélée à une forte accumulation intracellulaire d'acide. La neutralisation ultérieure de cet acide serait assurée par un import de potassium, importation stœchiométriquement associée à l'export de protons. La nature dynamique de ce processus, accrue par le catabolisme de l'acide, conduit à un déséquilibre entre les teneurs intracellulaires et celles correspondant à l'homéostasie cellulaire. Ce déséquilibre qui confèrerait un potentiel de neutralisation est de nature à expliquer l'« adaptation » transitoire quantifiée par la capacité fermentaire. En métabolisme mixte entretenu par une limitation de la vitesse d'oxydation, cette disponibilité énergétique oxydative instantanée n'existe pas et l'acidification est plus marquée avec un facteur d'accumulation de l'acide plus faible. Le retour à l'homéostasie cellulaire passe par une importation progressive de potassium (pouvant être ATP dépendante) qui, en raison d'une cinétique nettement plus faible, n'induit pas un déséquilibre susceptible de conduire les cellules dans un état d'« adaptation ». La réponse à un pulse d'acide dépend donc de plusieurs facteurs : l'accumulation instantanée, fonction de la molarité équivalente de l'ajout et de la concentration cellulaire présente, de la disponibilité énergétique oxydative, de la disponibilité exocellulaire en potassium, du mécanisme (proton ou ATP dépendant) et de la dynamique d'importation de potassium. Dans nos conditions opératoires, le pH_i semble

varier dans une plage qui semble permissive sans qu'il n'y ait une réduction des capacités anaboliques. Pour d'autres conditions opératoires, il n'est pas exclu que la diffusion première de l'acide induise une baisse de pH_i (en particulier atteinte de la capacité respiratoire en mode oxydatif ou découplage) suffisamment forte pour inhiber l'activité anabolique. Ainsi, l'« overflow » de carbone résultant pourrait se traduire naturellement vers une production d'éthanol sans que cette voie ne corresponde à une demande énergétique nette.

III.3.1.c. La pression osmotique en métabolisme respiro-fermentaire

Un des faits majeurs est que dans toutes les conditions, la diffusion de l'acide est associée à un flux de cations, principalement le potassium. En condition de métabolisme oxydo-réductif, l'absence de catabolisme de l'acide propionique se traduit par l'accumulation progressive de ce cation qui trouve sa limite lorsque la concentration atteint la valeur de 360 mM, valeur identique à celle obtenue en mode oxydatif. Il semblerait qu'il s'agisse d'une teneur limite qui peut être associée à un accroissement de la pression de turgescence critique comme le montre l'obtention d'une accumulation identique lors du second ajout. Ainsi, tout mécanisme d'homéostasie du pH_i trouverait sa limite dans l'atteinte d'une pression de turgescence critique due à l'import de potassium. Cette situation est de nature à expliquer l'« adaptation » acquise au milieu utilisé pour la mesure de la capacité fermentaire. La seconde constatation est que la consommation totale de l'acide ne provoque pas d'exportation exocellulaire de potassium. La perte de l'« adaptation » malgré ce pool intracellulaire plaide pour une séquestration probablement vacuolaire du cation. Toutefois, si cette séquestration existe, il semblerait que sa disponibilité soit plus grande que le potassium exocellulaire comme en témoigne une accélération de la cinétique d'accumulation lors du second pulse.

L'implication hypothétique du tréhalose dans le mécanisme de régulation de la pression osmotique avec une dégradation induite n'est pas observée ici. Ce comportement ne correspond pas aux observations de Arneborg et coll. (1995) qui notent, en culture continue en condition d'anaérobiose, une diminution de la concentration en tréhalose comprise entre 16 et 18 % selon le taux de croissance utilisé avec une alimentation supplémentée en d'acide acétique (33 mM). Toutefois, le niveau basal de tréhalose très faible (1 % PS) pourrait expliquer la faible contribution de ce métabolite dans le processus de régulation.

L'évolution de la teneur intracellulaire en magnésium, comparativement aux cultures de référence, semble confirmer son implication dans les seuls processus oxydatifs. Son rôle est largement décrit dans la littérature dans toutes les réactions ATP dépendantes (Serrano, 1978). Nous aurions pu penser que ce cation jouait un rôle au niveau des enzymes impliquées dans la dégradation de l'acide propionique ; en effet, le magnésium est décrit dans la littérature comme étant un co-facteur de la propionyl-CoA

carboxylase (McKeon et Wolf, 1982). Néanmoins, Pronk et coll. (1994) ont montré que chez *S. cerevisiae*, la voie de dégradation de l'acide propionique n'implique pas cette enzyme mais l'acétyl-CoA synthase. Donc, il semblerait plus probable que l'accumulation de magnésium soit corrélée à l'accroissement de l'activité ATPasique précédemment discutée.

Chapitre IV : Effecteurs non métabolisables et généérés : l'acide sorbique et le CO_2 , en métabolisme oxydatif

I. Introduction

Nous avons focalisé les premiers travaux sur l'acide propionique qui est un agent conservateur largement répandu dans l'industrie agroalimentaire. Les différences de comportement observées lors de cultures oxydatives et oxydo-réductives nous ont conduit à l'étude d'un acide faible non métabolisable en métabolisme oxydatif par *S. cerevisiae* : l'acide sorbique (Mollapour et Piper, 2001a). De plus, des observations en terme de bilan carbone ont fait apparaître des comportements singuliers pouvant être imputés à une accumulation intracellulaire du dioxyde de carbone. Ainsi, le CO₂, considéré comme un acide faible, pourrait par sa dynamique de production instantanément modifier la réponse à un stress acide et/ou interférer sur la réponse elle-même. L'acide sorbique et le dioxyde de carbone sont tous deux, comme l'acide propionique, utilisés comme agents conservateurs. Ainsi, il semble possible de discriminer les effets spécifiques à chaque acide utilisé.

Le sorbate de potassium de formule C₆H₇O₂K (E 202) est utilisé pour la conservation des aliments et des tests à large échelle ont montré que l'acide sorbique ne présente aucun danger pour la santé. Dans l'organisme, il se décompose et est excrété comme un acide gras naturel. L'action conservatrice s'applique aux levures et aux moisissures. Il est utilisé dans la préparation de nombreux produits : fruits secs, limonades, sauces, ketchup, marmelade, vin, articles de biscuiterie, saucisson sec (traitement de surface), préparations à base de poissons préemballées, fruits pour yogourts, fromage, margarine et mayonnaise (Walser et coll., 2001). Son pK_a est de 4,76, très proche de ceux des acides propionique et acétique. Les niveaux acceptés dans les aliments sont compris entre 0,05 et 0,2 % (Walser et coll., 2001).

Le CO₂ (E 290) est aussi considéré comme un agent conservateur chimique. Il est utilisé pour la conservation des sodas. Sa non toxicité, son élimination facilitée et son spectre large d'action en font un bon agent antimicrobien dans le cadre de la conservation des aliments.

II. L'acide sorbique

II.1. Etudes préliminaires

L'impact de l'acide sorbique a été, dans un premier temps, expérimenté en fioles d'Erlenmeyer par analyse de la réponse sur la croissance suite à un ajout, afin d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices de la croissance cellulaire. L'inhibition est totale pour des concentrations supérieures à 4,45 mM et pour des concentrations comprises

entre 0,9 et 1,8 mM, la croissance est momentanément inhibée avant de se poursuivre avec un taux de croissance identique à celui précédant le pulse. Nous avons donc décidé de travailler à une concentration en acide sorbique de 1,8 mM.

L'acide sorbique a été aussi testé en respirométrie sur deux milieux différents : le milieu salin initial et le milieu M1 à forte pression osmotique (cf. § III.7., Matériel et Méthodes). Ce même test a été réalisé précédemment avec l'acide propionique (cf. § IV.2. Chapitre II, Résultats). Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec l'acide propionique, en terme de dynamique de réponse, d'obtention des maxima et des effets pH et milieu. En effet, sur le milieu salin, la vitesse spécifique est divisée par deux dès l'ajout de 2,2 mM d'acide sorbique mais est restaurée progressivement dans le temps. En revanche pour le milieu M1, pour une concentration en acide sorbique de 18 mM, la vitesse est diminuée de 40 % mais reste constante. Comme pour l'acide propionique, des concentrations en acide sorbique plus élevées sont nécessaires pour provoquer une inhibition de la respiration sur le milieu M1. Cette similarité de comportement démontre donc que l'inhibition de la respiration n'est pas due à la nature de l'acide utilisé mais résulte bien de la fonctionnalité acide de la molécule et des mécanismes induits.

Des concentrations en acide sorbique plus faibles qu'en acide propionique sont nécessaires pour inhiber la croissance ; la levure est donc plus sensible à l'acide sorbique qu'à l'acide propionique. Cette plus forte sensibilité est décrite dans la littérature comme provenant du caractère liposoluble de l'acide (Ferreira et coll., 1997). En effet, plus l'acide est lipophile, plus son action inhibitrice sera élevée, ainsi, les acides sorbique et benzoïque sont plus néfastes sur la physiologie de la levure que les acides propionique et acétique (Ferreira et coll., 1997).

II.2. Pulses successifs d'acide sorbique

II.2.1. Conduite de la culture

Les conditions de culture sont identiques à la culture de référence, c'est-à-dire un pH de 5 et un taux de croissance fixé à $0,1 \text{ h}^{-1}$ (Figure 50, Phase 1). Le premier pulse d'acide sorbique est réalisé pour une concentration cellulaire de 40 g.L^{-1} (Phase 2). Quarante minutes après le premier pulse, des oscillations de la respiration associées à des accumulations d'éthanol sont apparues et ont persisté pendant deux heures (Phase 3). Nous avons déjà observé empiriquement qu'une baisse du débit de sucre stoppait les oscillations, le débit de sucre a donc été diminué d'un facteur 2 puis ré-augmenté progressivement pour retrouver des conditions identiques à celles précédant le premier ajout (Phase 4). Un deuxième pulse d'acide sorbique de concentration identique est réalisé pour une concentration cellulaire de 60 g.L^{-1} (Phases 5 et 6).

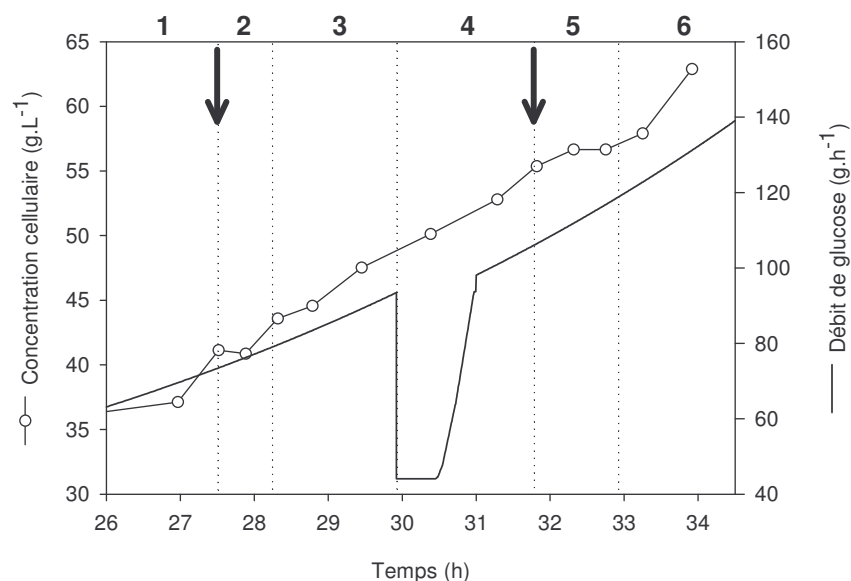


Figure 50 : Evolution de la concentration cellulaire et du débit de glucose selon différentes les phases d'une culture en mode oxydatif, à pH 5 et à μ de $0,1 \text{ h}^{-1}$. Les flèches indiquent les pulses d'acide sorbique.

II.2.2. Réponses des variables macroscopiques

Le premier pulse d'acide sorbique (1,8 mM, concentration finale) est réalisé dans le réacteur à 27,5 h de culture. Survient alors une augmentation immédiate de la vitesse spécifique de respiration qui passe de la valeur de 2,6 à 4,2 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ instantanément au pulse (Figure 51.A.) et la respiration reste constante pendant 45 minutes à une valeur élevée de 3,8 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ (Phase 2). Ce comportement est qualitativement similaire aux phases successives a et b de notre culture de référence. Durant cette phase, nous pouvons remarquer un arrêt de la croissance cellulaire qui reprend en début de phase 3 (Figure 50).

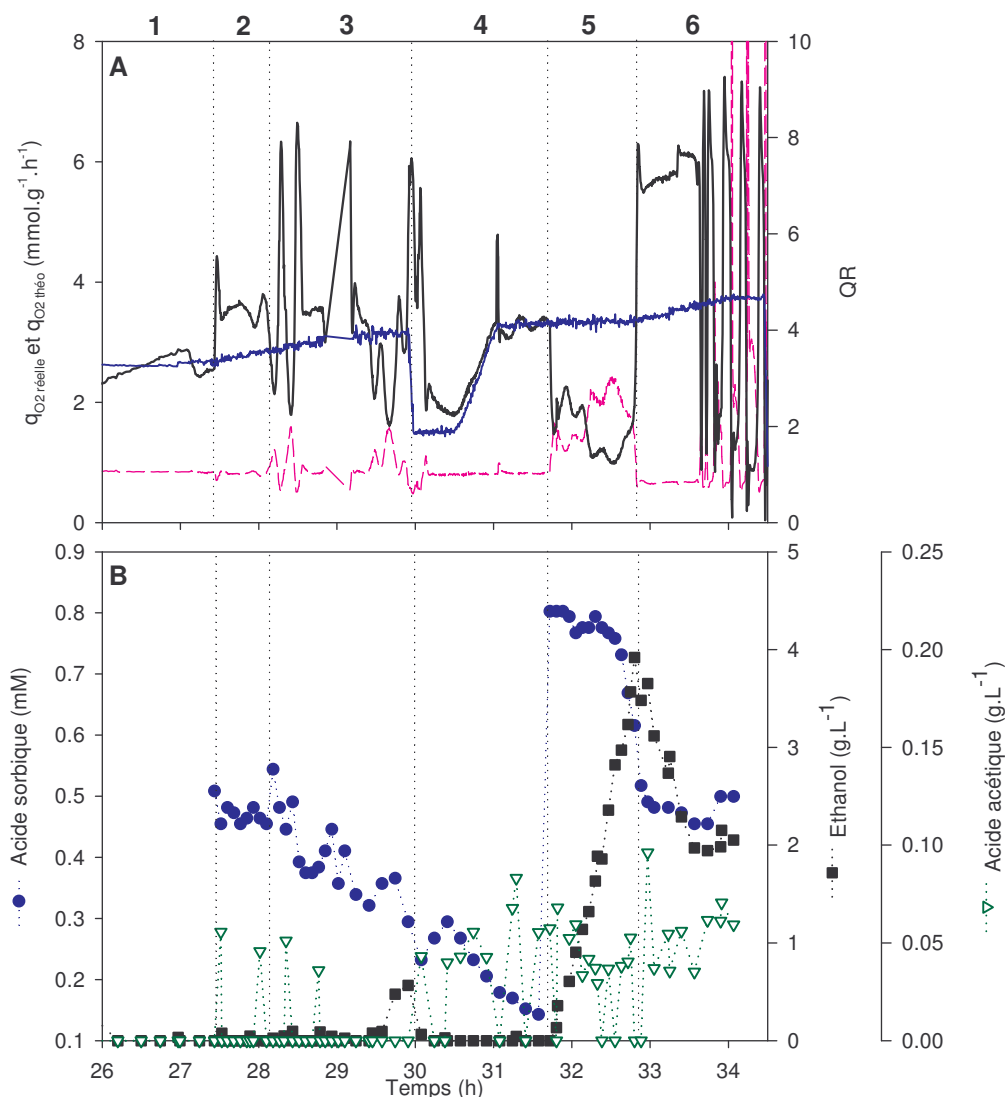


Figure 51 : Dynamique de la réponse à deux pulses successifs d'acide sorbique sur des levures en mode oxydatif à pH 5 et μ 0,1 h^{-1} . A : Evolution des vitesses spécifiques de respiration réelle (—) et théorique (—) et du QR (—). B : Concentrations en acide sorbique, éthanol et acide acétique au cours du temps.

Dès que la vitesse de respiration est revenue à une valeur proche de celle caractéristique d'un métabolisme balancé, des oscillations spontanées de la respiration sont apparues (Phase 3) associées à des perturbations du coefficient respiratoire. Au cours de cette phase, malgré de très faibles accumulations d'acide acétique et d'éthanol (respectivement inférieures à 55 mg.L^{-1} et 0,7 g.L^{-1}), les dynamiques de respiration par rapport à la vitesse théorique sont révélatrices d'une succession de bascules métaboliques oxydatives et oxydo-réductives. Les accélérations de respiration correspondent au co-catabolisme éthanol-acétate caractérisé par un QR inférieur à 1 alors que la réduction de la consommation d'oxygène est caractéristique d'une bascule vers le métabolisme oxydo-fermentaire avec un coefficient respiratoire nettement supérieur à 1 (Figure 51.A. et B.). Ce régime oscillatoire est stoppé par une diminution

du débit de sucre qui sera ultérieurement restauré à sa valeur nominale afin de réaliser le deuxième pulse dans des conditions métaboliques maîtrisées (Phase 4). Le coefficient respiratoire revient à une valeur proche de 1 et confirme le retour à un métabolisme oxydatif stabilisé.

Durant la phase 5, suite à un deuxième pulse d'acide sorbique de concentration identique, la réduction de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène jusqu'à une valeur de 1 mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹ correspond à la bascule vers le métabolisme oxydo-réductif confirmée par l'accumulation d'éthanol et un coefficient respiratoire supérieur à 2. Il est à noter que durant cette phase, comme tout au long de cette expérimentation, la concentration résiduelle en glucose n'a jamais été supérieure à 40 mg.L⁻¹. La phase 6 est caractérisée par un accroissement de la vitesse de respiration stabilisée à une valeur proche de 6 mmoles.g de biomasse⁻¹.h⁻¹, pouvant être en partie attribuée à la consommation simultanée d'éthanol et de glucose comme en atteste un coefficient respiratoire inférieur à 1. Après une heure, se met en place un régime oscillatoire qualitativement proche de celui précédemment observé mais d'une amplitude nettement plus grande et d'une fréquence accélérée.

II.2.3. Evolution des pools cationiques et sorbiques

Les concentrations initiales en potassium et magnésium sont respectivement de 190 et 58 mM. Suite au pulse d'acide sorbique, nous observons durant la phase 2, une entrée rapide de potassium et de magnésium jusqu'à atteindre les concentrations respectives de 280 et 63 mM (Figure 52). Une seconde dynamique d'accumulation intracellulaire de potassium se poursuit tout au long des phases 3, 4 et 5 jusqu'à une teneur de 320 mM. Suite au second ajout, la seule importation équivalente de 20 mM en potassium semble confirmer l'hypothèse d'une limitation de l'accumulation cationique (évaluée à 360 mM, cf. § III.9.5., chapitre II, Résultats) lorsque celle-ci correspond à l'obtention d'une pression de turgescence limite. Cette accumulation intervient pour différents régimes : métabolique oscillatoire (phase 3), strictement oxydatif (phase 4) et oxydo-réductif (phase 5).

L'évolution de la teneur intracellulaire en magnésium permet de corréliser son accumulation à une intensification des activités ATP-dépendantes durant les phases pour lesquelles la vitesse spécifique de consommation d'oxygène est supérieure à celle correspondant à un métabolisme balancé (Phase 2 principalement). La diminution progressive du pool intracellulaire jusqu'à 32 heures est due à une dilution de l'acquis dans la biomasse néo-formée. Pour le second ajout, une ré-accumulation uniquement lorsque le métabolisme oxydatif est restauré et non lors de la mise en présence de l'acide permet de conclure sur une importation de magnésium pour satisfaire les activités

mettant en jeu une dépense énergétique sous forme d'ATP indépendamment de la seule mise en présence d'un acide faible.

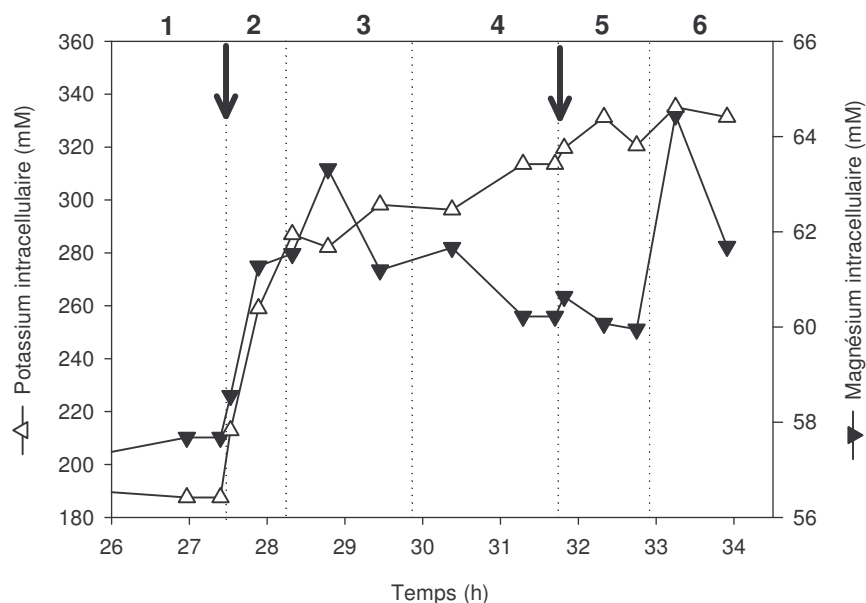


Figure 52 : Evolution des teneurs intracellulaires en cations suite à deux pulses successifs d'acide sorbique (indiqués par les flèches) pour des conditions oxydatives de croissance à pH 5 et μ de 0,1 h⁻¹.

Lors des deux pulses d'acide sorbique, seule une fraction de l'acide injectée est retrouvée instantanément dans le surnageant de culture (26 et 38 % de la quantité totale de l'acide injecté respectivement pour le premier et le second pulse). Le facteur d'accumulation est relativement proche de celui obtenu avec l'acide propionique. Ces facteurs et concentrations ont pu être calculés grâce à la mesure du volume intracellulaire qui est de 1,5 mL.g de biomasse⁻¹ tout au long de la culture, indépendamment des différents états physiologiques caractérisés. Un facteur d'accumulation égal à 49 proche de celui obtenu pour les cultures de référence avec l'acide propionique montre que, avec des pKa de ces acides proches (respectivement 4,76 et 4,87), d'une part l'acide sorbique est accumulé instantanément par diffusion passive et d'autre part, un mécanisme énergétiquement dépendant intervient dans la restauration du pH_i avec une estimation du $Y_{ATP, Acide}^*$ identique à celui obtenu pour l'acide propionique (Tableau 24).

Tableau 24 : Concentrations en acide sorbique intracellulaire, facteur d'accumulation, pH_i et $Y_{ATP, Acide}^*$ suite aux deux pulses d'acide sorbique (1,8 mM) pour un régime oxydatif à pH 5 et μ 0,1 h⁻¹.

Pulse	[A] _{in} (mM)	F	pH _i	$Y_{ATP, Acide}^*$
Premier	23,8	47	6,9	7,51
Second	15,6	20	6,9	xx

La discussion de l'évolution de l'acide sorbique repose sur le postulat de l'absence d'une voie de dégradation chez *S. cerevisiae* (Mollapour et Piper, 2001a) qui amène à interpréter les résultats obtenus en terme d'accumulation et par voie de conséquence, de variation estimée du pH_i (Figure 53).

Durant la phase 2, l'accumulation massive de potassium ne provoque pas une entrée d'acide sorbique selon un mécanisme de déplacement d'équilibre tel que décrit pour l'acide propionique. Par la suite, l'entrée lente de l'acide est corrélée à une augmentation du pH_i jusqu'à une valeur proche de 7,4, valeur relativement forte par rapport aux valeurs couramment admises (Phases 3 et 4).

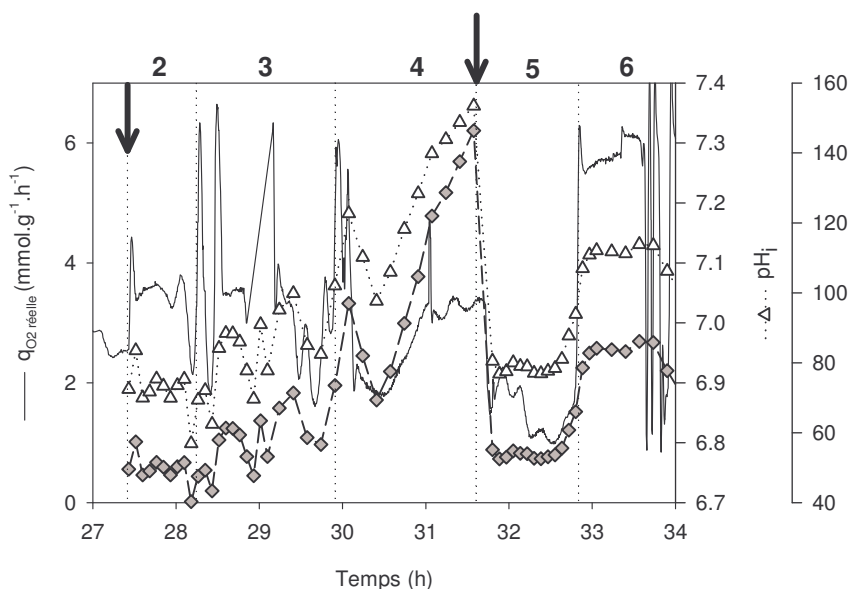


Figure 53 : Evolution du pH_i , de F et de q_{O_2} suite à deux pulses d'acide sorbique en métabolisme oxydatif, pH 5 et μ 0,1 h^{-1} . Les flèches indiquent les pulses d'acide sorbique.

L'ensemble de ces constatations, malgré une forte analogie avec celles obtenues avec l'acide propionique en métabolisme oxydo-réductif, révèle des spécificités probablement liées aux hypothèses réductrices retenues pour l'estimation du pH_i .

Dans la littérature, l'acide sorbique n'est pas décrit comme un agent conservateur « classique » et notamment, il est actif à un pH de 6,5 alors qu'en théorie, les acides faibles ont peu d'activité à ce pH (Stratford et Anslow, 1996). Ces auteurs suggèrent que l'acide sorbique agirait comme une substance active au niveau de la membrane plutôt que comme un acide faible. Des degrés d'inhibition similaires entre l'acide sorbique et ses dérivés hydroxylés et acétaldéhydiques suggèrent que l'action de l'acide sorbique ne se résume pas à sa seule fonction carboxylique comme agent conservateur « classique » de type acide faible (Stratford et Anslow, 1998).

Ces constatations nous laissent penser que la fraction cytosolique de l'acide sorbique est plus faible que celle retenue pour le calcul du facteur de concentration et ainsi, les valeurs de pH_i réelles sont plus faibles que celles présentées. De plus une

analyse plus fine de la cinétique d'entrée de l'acide fait apparaître au cours des phases 3 et 4, des oscillations sur la concentration en acide sorbique exocellulaire (Figure 54). A toute réduction de la respiration est associée une exportation partielle de l'acide sorbique, cette réduction est due soit à une bascule vers le métabolisme réductif (Phase 3) soit à une réduction imposée de la vitesse spécifique catabolique en métabolisme purement oxydatif (début de la phase 4). A l'inverse, une réincorporation d'acide sorbique est corrélée à une augmentation de la respiration donc potentiellement à de la génération d'énergie. Le régime oscillatoire serait entretenu par la co-existence de deux mécanismes antagonistes : une accumulation d'acide croissante liée à la neutralisation par le potassium avec une amélioration de l'homéostasie pH et un effet inhibiteur croissant intrinsèque à la molécule de l'acide sorbique. Il semblerait qu'en fin de phase 4, un équilibre dynamique puisse être restauré rendant possible l'analyse d'un second ajout d'acide.

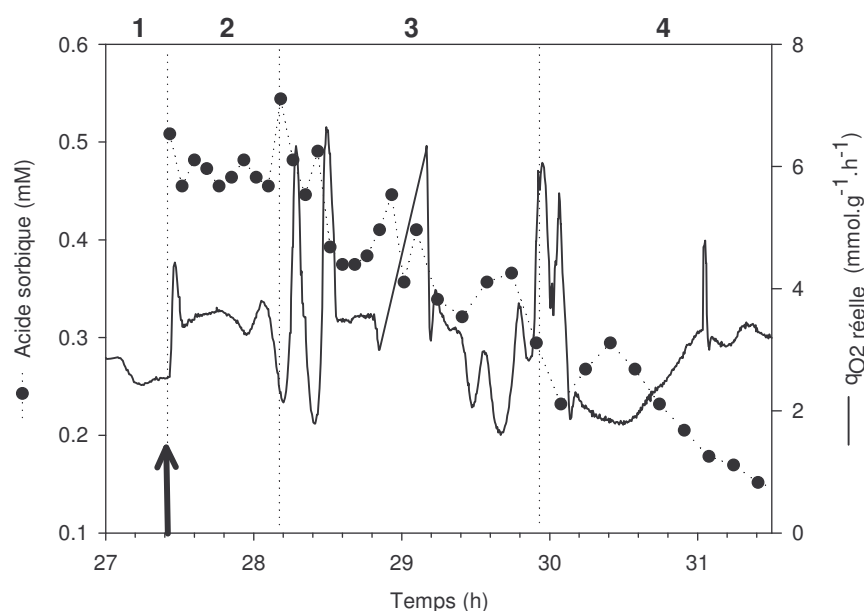


Figure 54 : Détail des oscillations de la respiration et de la concentration en acide sorbique exocellulaire suite à un pulse d'acide sorbique, pour des conditions de culture de pH 5 et μ 0,1 h⁻¹. La flèche indique le pulse.

Le second pulse est réalisé lorsque la concentration résiduelle en acide sorbique est de 0,13 mM et conduit à une acidification identique à celle précédemment obtenue, indépendamment de l'acquis cellulaire. Le pH_i estimé est alors de 6,9 qui, en tenant compte des réserves ci-dessus décrites, est suffisamment faible pour expliquer une inhibition de la chaîne respiratoire par une augmentation d'un gradient de protons transmembranaire mitochondrial. Cette acidification conduit à la mise en place de la voie fermentaire. L'import de potassium de 32 à 33 h semble de nature à restaurer un pH_i physiologique compatible avec la restauration d'un métabolisme purement oxydatif sur glucose et éthanol. Ainsi, avec la possibilité d'exportation de protons par l'activité ATP-ase (confirmée par l'accumulation de magnésium), le pH_i est restauré. Le type de

mécanisme impliqué dans la restauration de l'homéostasie entre la phase 3 (accumulation de potassium) et la phase 5 ou 6 (activité ATP-ase) est de nature à expliquer la différence de cinétique d'assimilation de l'acide sorbique ($10 \cdot 10^{-3}$ et $40 \cdot 10^{-3}$ mmol.g⁻¹.h⁻¹ respectivement, vitesses calculées pour le premier pulse sur la totalité de la période d'incorporation de l'acide et pour le second, uniquement sur la phase d'accélération de l'entrée de l'acide).

Cette restauration du pH_i correspond à une concentration résiduelle d'acide sorbique quasiment stabilisée à 0,45 mM ; le léger déclin mesuré peut être attribué à la croissance cellulaire, c'est à dire à un volume cellulaire d'accumulation augmentant proportionnellement à la quantité de biomasse.

Le comportement ultérieur reste inexplicable et mériterait à lui seul une étude spécifique. Aucune référence bibliographique ne reporte des oscillations spontanées aussi amples et fréquentes (période de 6 min). Nous avons aussi pu initier ce comportement par un ajout d'acide acétique en métabolisme oxydatif alors que les cellules étaient en condition limite de pression de turgescence. La seule hypothèse que nous pouvons avancer est que la moindre variation de pH_i alors que les cellules sont dans un état particulier, provoque une saturation des mécanismes susceptibles de maintenir l'homéostasie cellulaire. La bascule d'un métabolisme oxydatif vers un métabolisme oxydo-réductif provoque des modifications environnementales (accumulation d'acide acétique, production de dioxyde de carbone,...) de nature à entretenir un régime oscillatoire. Ce régime est caractéristique d'un processus régulé divergent.

II.2.4. Les sucres de réserves

Les teneurs en tréhalose et glycogène en métabolisme balancé sont respectivement de 5,5 et 4 % PS, valeurs proches de notre culture de référence. Suite au pulse d'acide sorbique, la fraction massique des deux sucres décroît progressivement durant les phases 2 et 3 (Figure 55).

Pour la phase 2, la respiration supplémentaire peut être associée à la dégradation du tréhalose, cette consommation se justifie par un besoin énergétique pouvant être satisfait par une dégradation du carbone endogène.

Entre 30 et 32 h, la reconstruction de ces réserves peut être attribuée à la réduction très nette du taux de croissance imposé par la conduite conformément aux résultats de Guillou (1996) où pour un taux de croissance de 0,1 h⁻¹ divisé par 2, la teneur en sucres de réserves est multipliée par 1,5.

Lors du second pulse, la mobilisation évidente des sucres est à mettre en parallèle avec des résultats similaires obtenus par Poilpré (2002). Il montre que pour une bascule vers le métabolisme fermentaire lors des oscillations en métabolisme oxydatif limité par la source de carbone, il y a une mobilisation des sucres de réserves indépendamment de

l'induction par un acide. Une demande énergétique supplémentaire est difficilement justifiable avec la réduction très nette de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène.

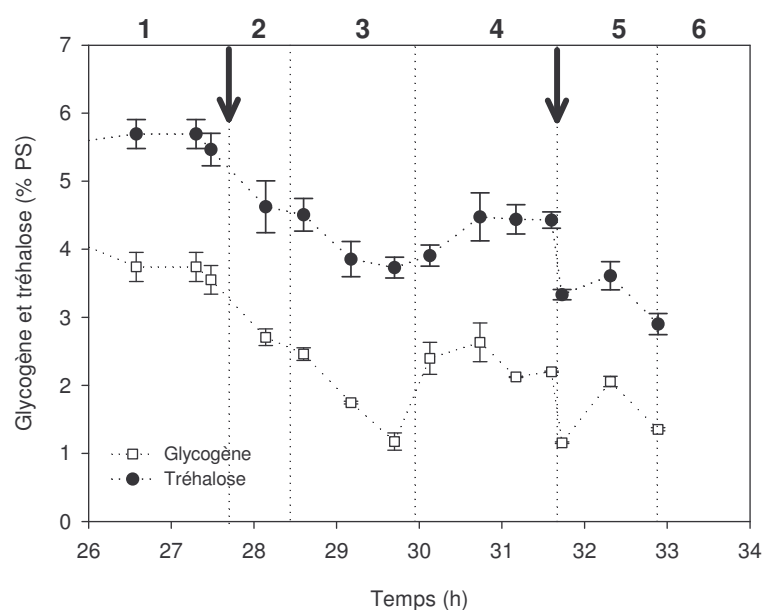


Figure 55 : Dynamique des sucres de réserves suite à deux pulses successifs d'acide sorbique pour des conditions oxydatives de croissance à pH 5 et μ 0,1 h⁻¹. Les pulses d'acide sont indiqués par les flèches.

II.2.5. Capacité fermentaire

La figure 56 reporte les résultats obtenus pour l'analyse de la capacité fermentaire pour un essai témoin et un test en présence d'acide propionique.

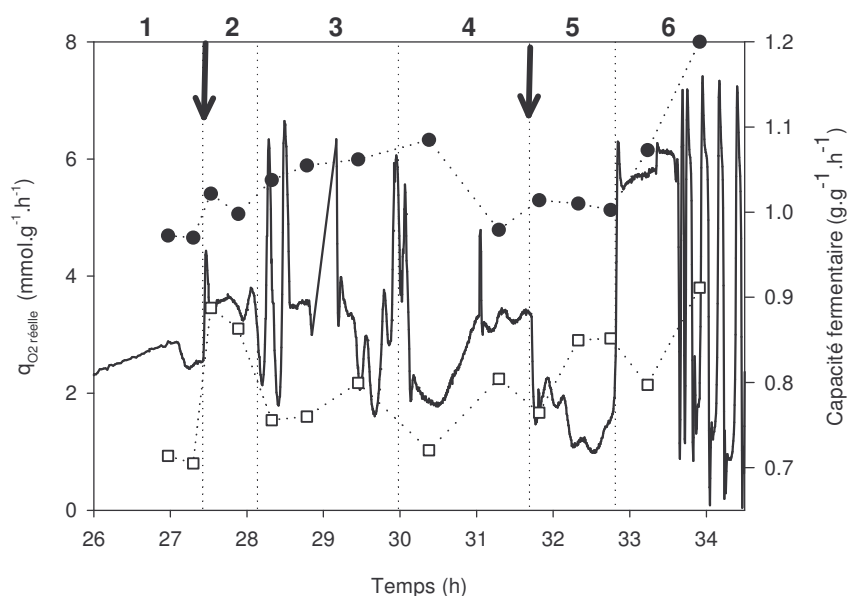


Figure 56 : Vitesse spécifique de respiration (—) et capacité fermentaire en absence (●) et en présence d'acide (□) pour une culture en métabolisme oxydatif à pH 5 et μ de 0,1 h⁻¹, suite à deux pulses d'acide sorbique. Les pulses d'acide sont indiqués par les flèches.

La vitesse spécifique de production d'éthanol basale ($0,97 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) augmente progressivement jusqu'à $1,1 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ concomitamment avec l'accumulation de potassium de manière similaire aux levures ayant accumulé le propionate de potassium (cf. § IV.2.2., Chapitre II, Résultats). Toutefois, ce gain de capacité est ici nettement plus faible. Suite au second ajout, cette même constatation peut être faite pour le dernier essai avec une valeur beaucoup plus élevée obtenue pour des cellules ayant basculé de façon périodique dans un régime fermentaire. Ces résultats confortent les hypothèses d'une « acclimatation » des levures à la forte osmolarité du milieu de mesure. Néanmoins, l'amplitude peut être modulée par un effet potentiellement inhibiteur de l'acide sorbique et par une capacité fermentaire accrue par la préexistence de cette activité « in situ ». L'adaptation au stress acide que l'on évalue par la différence entre les vitesses spécifiques du témoin et du test (en début de culture $0,3 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) se révèle pour les cellules récoltées en phase 2 suite au premier ajout (différence de $0,12 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). L'interprétation du second ajout est délicate du fait même de la mise en place d'un régime oxydo-réductif au niveau du réacteur pour les cellules.

Bien que les résultats n'aient pas été présentés dans ce mémoire, les cellules cultivées en métabolismes oxydatif et mixte et exposés à l'acide propionique affichent une « adaptation » à l'acide sorbique lors des tests d'évaluation de la capacité fermentaire. L'ensemble des tests croisés ainsi réalisés amène à une première constatation qui est que des cellules ayant subi un stress acide présentent une « adaptation » transitoire en présence d'un autre acide. Ces résultats corroborent les observations de Warth (1989) qui montre que des levures se développant en présence d'acide benzoïque augmentent leur résistance à une exposition ultérieure aux acides benzoïque, propionique et acétique.

Durant la culture en fermenteur, le second ajout d'acide sorbique à des cellules ayant déjà accumulé le sorbate de potassium provoque une déviation métabolique vers la voie fermentaire. L'absence d'une amélioration du pouvoir fermentaire pour les cellules en phases 3 et 4 en présence d'acide sorbique impose à rechercher ailleurs que dans la seule redistribution du flux carbone, le mécanisme d'adaptation caractérisé durant la phase 2. Ce dernier est bien lié à une capacité cellulaire permettant de faire face à l'acidification associée à la diffusion passive de l'acide. La nature transitoire du phénomène plaide pour une aptitude à neutraliser cet excès d'acide et ainsi de garantir un pH_i qui sans être optimal, permet un rétablissement plus rapide de l'homéostasie cellulaire et des capacités cataboliques maximales. Ce pouvoir neutralisant peut être attribué à une accumulation d'ions potassium dont la teneur intracellulaire est temporairement supérieure à la teneur requise pour cette fonctionnalité. Ce déséquilibre pourrait résulter de la différence de dynamique mis en place par la cellule pour réguler au

mieux deux grandeurs fondamentales de l'homéostasie cellulaire : le pH et la pression osmotique. A l'accumulation de potassium serait associée une fonction positive qu'est le rétablissement d'un pH_i optimal et induirait un effet négatif, à savoir l'accroissement de la pression de turgescence.

Cette hypothèse est particulièrement étayée par deux observations. La première réside dans une très nette « adaptation » mesurée lors de la phase b pour laquelle il a été noté une accumulation massive de potassium sans accumulation d'acide équivalente. La seconde est qu'il n'est possible de caractériser un état d'« adaptation » que lorsque a été mesurée une dépense énergétique nettement supérieure à l'énergie requise pour l'import du potassium.

Afin d'aborder la complexité et l'importance de la dynamique dans les mécanismes décrits, nous avons développé un modèle structuré intégrant la compartimentation cellulaire afin de rendre compte de la redistribution des flux carbone, de l'activité ATPasique, du transport actif du potassium, de la diffusivité de l'acide faible, de la dégradation de l'acide faible et des différents équilibres entre les espèces chimiques (proton, potassium, ammoniac et pouvoir tampon cytosolique). Ainsi, pour toutes ces fonctions, existe une constante de temps propre et les vitesses sont dépendantes d'une fonction d'inhibition par la variation du pH_i et d'une fonction d'inhibition par la pression de turgescence. La figure 57 reporte la structure simplifiée du système. Le modèle ainsi posé peut être décrit par un système de 26 équations différentielles qui ne seront pas développées, de même que l'algorithme de calcul.

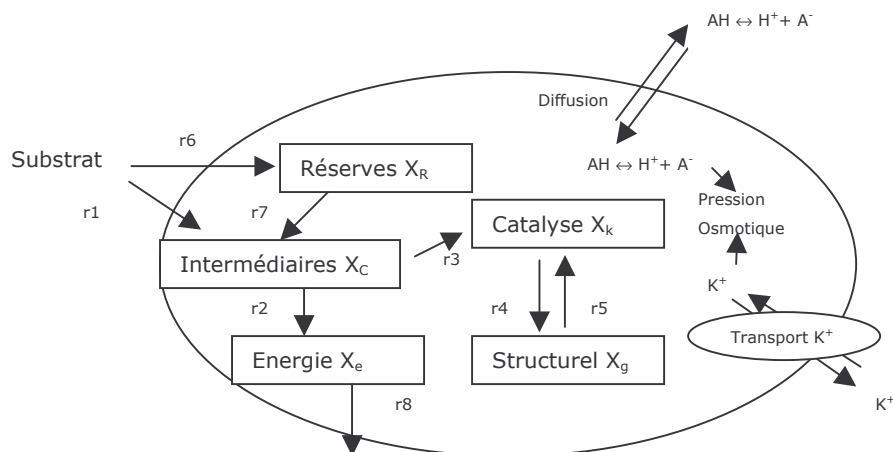


Figure 57 : Structure du modèle compartimenté.

Le paramétrage du modèle est basé sur une évaluation grossière des constantes de temps en accord avec les ordres de grandeur expérimentalement obtenus et sur la base des différents rendements matière mesurés. Ainsi, il ne s'agit pas d'avoir une représentation quantitativement précise de l'évolution des différentes variables mais de

visualiser qualitativement leur comportement dynamique en accord avec les mécanismes introduits. La résolution du système d'équation a été réalisée sous MATLAB (toolbox ODE) et ne seront présentés que les résultats des principales variables d'état discutées précédemment (Figure 58).

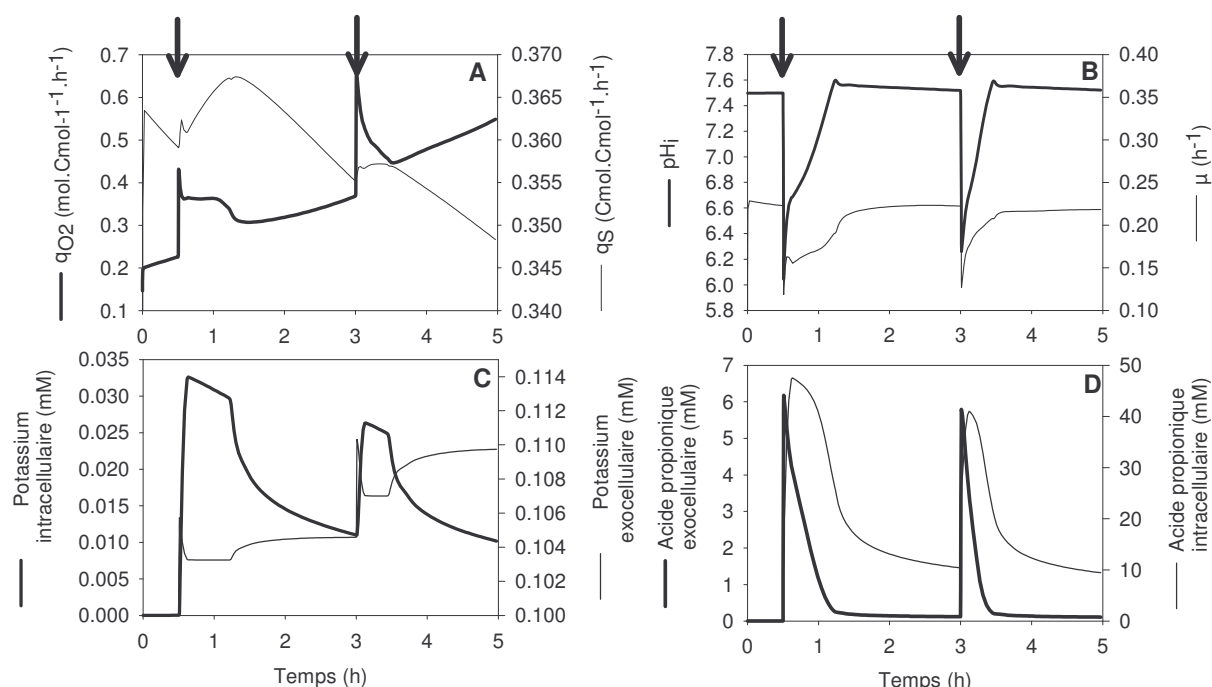


Figure 58 : Evolution des différentes variables selon le modèle développé lors de cette étude. A : vitesses spécifiques de consommation du substrat et de l'oxygène. B : pH_i et taux de croissance. C : Concentrations en potassium exocellulaire et intracellulaire. D : Concentrations en acide exocellulaire et intracellulaire.

L'évolution de la q_{O_2} simulée est en accord avec nos résultats macrocinétiques. Le phénomène d'accumulation intracellulaire rapide de l'acide propionique est parfaitement décrit qualitativement et quantitativement et le pH intracellulaire subit une forte chute suite aux pulses d'acide avec un retour au pH intracellulaire nominal sans qu'il y ait une réduction de l'excès de respiration. Le point intéressant est l'évolution du potassium qui ne suit pas les mesures expérimentales puisque nous avons une exportation simulée qui ne correspond pas avec la séquestration expérimentalement observée. Ainsi ce serait cet écart non élucidé mécanistiquement sur la plan biologique mais constaté expérimentalement qui conférerait cette capacité de neutralisation lors d'une exposition ultérieure à l'acide. En effet, la simulation montre qu'une teneur en potassium intracellulaire supérieure à la valeur nominale permet de réduire très nettement l'amplitude des effets négatifs d'un second ajout d'acide et qu'avec une importation moindre de cations, la dépense énergétique (q_{O_2}) est réduite.

III. Le CO₂

Suite au pulse d'acide, nous observons des vitesses de respiration plus élevées à la fois pour la consommation d'oxygène mais aussi pour la production de dioxyde de carbone. Le CO₂ doit être considéré comme un acide faible, il est intéressant de savoir s'il participe aux phénomènes d'acidification du cytosol de la levure et dans quelle mesure sa génération intracellulaire influe sur les réponses aux stress acide.

Selon la littérature, les auteurs s'accordent sur le fait qu'il n'y pas de transporteur spécifique pour les formes carbonatées du dioxyde de carbone et que les transferts transmembranaires dépendent essentiellement d'un mécanisme de diffusion dépendant du gradient de CO₂ dissous (Peña, 1975, Figure 59).

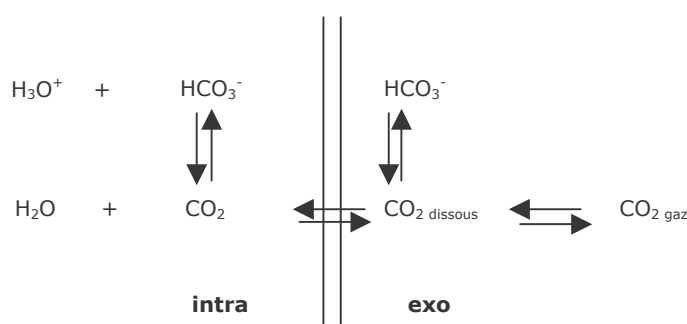


Figure 59 : Schéma des équilibres des différentes formes du CO₂ entre le milieu extérieur et le cytosol.

L'interconversion du CO₂ et du bicarbonate est réalisée intracellulairement par une anhydrase carbonique codée par le gène *NCE103*. Son rôle principal pendant la croissance de *S. cerevisiae* sur glucose et ammonium consiste en une provision de carbone inorganique pour les réactions de carboxylation bicarbonate-dépendante catalysées par la pyruvate carboxylase, l'acétyl-CoA carboxylase et la carbamoylphosphate synthase (Aguilera et coll., 2005b).

L'objectif de cette étude est d'analyser la réponse dynamique suite à un stress CO₂, c'est à dire une variation indicelle de la concentration en CO₂ dissous. Une solution technique aurait pu consister dans un enrichissement de l'air entrant en dioxyde de carbone tel que décrit dans certaines études sur le sujet. Dans ces conditions, la constante de temps de la dynamique globale de la variation de la concentration en CO₂ dissous intracellulaire est fonction du coefficient global de transfert du CO₂ et du coefficient de diffusion transmembranaire. Afin de s'affranchir de ce temps de réponse difficilement quantifiable pouvant interférer avec le temps de relaxation des mécanismes biologiques potentiellement inductibles, notre choix a été d'augmenter la pression absolue dans le fermenteur en cours de culture. Cette augmentation permet d'obtenir une dynamique rapide de variation de la concentration en CO₂ dissous (exocellulaire et

intracellulaire) par un accroissement quasiment instantané de la pression partielle dans l'environnement gazeux comme décrit sur la figure 60. Ce calcul est obtenu par une simulation de l'évolution des différents formes en équilibre suite à une augmentation de pression dans le réacteur.

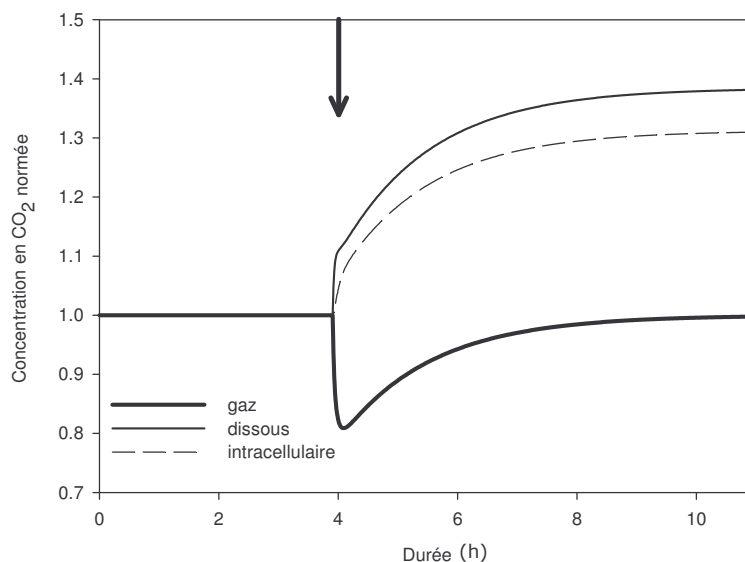


Figure 60 : Dynamique des différents équilibres du CO₂ suite à une augmentation de pression dans le réacteur (indiquée par une flèche).

III.1. Conduite de la culture

Dans un premier temps, la culture a été conduite afin d'obtenir une forte concentration cellulaire à taux de croissance de $0,1 \text{ h}^{-1}$. Dès l'obtention de 60 g.L^{-1} de biomasse, nous avons réalisé un incrément de pression (de 300 à 800 mBars) maintenue pendant 2 h 30. Le taux de croissance a été réduit à $0,05 \text{ h}^{-1}$ 30 minutes avant le retour à la pression initiale (300 mBars). A ce taux de croissance et pour une concentration cellulaire de 70 g.L^{-1} , nous avons ensuite appliqué un changement de pression identique, cette pression est maintenue constante pendant 1 h 30 puis diminuée à la pression de travail (300 mBars) (Figure 61). Les variations brusques de la valeur du coefficient de transfert d'oxygène (k_La) lors de l'augmentation de pression résultent de l'inadéquation entre les temps de réponse des capteurs et des systèmes de régulation (sonde à oxygène, analyseur de gaz, régulation de pH) et de la dynamique imposée au système. La valeur stabilisée du k_La obtenue par la suite valide le calcul effectué sur les vitesses de respiration.

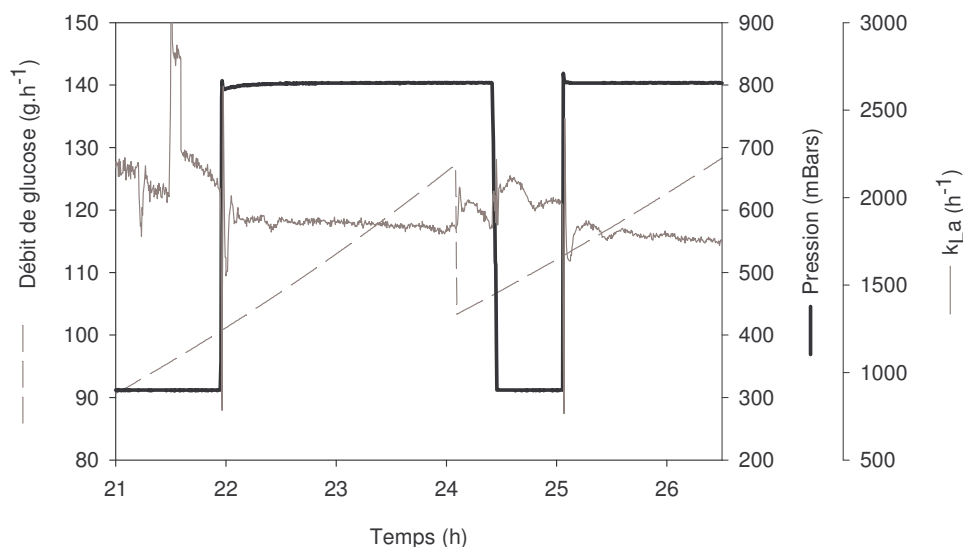


Figure 61 : Conduite de la culture avec deux augmentations de pression dans le réacteur.

III.2. Résultats

Le « stress CO_2 » réalisé n'a aucune influence sur le métabolisme de la levure qui reste en oxydatif pur confirmé par une non production d'éthanol et d'acide acétique et un coefficient respiratoire proche de l'unité. La réponse obtenue suite à ce « stress CO_2 » sur la vitesse de respiration est qualitativement semblable à celle observée en présence d'un acide faible, c'est-à-dire un accroissement très rapide de la q_{O_2} réelle qui, tant que la surpression est appliquée se maintient supérieure à la vitesse spécifique de respiration théorique (Figure 62). L'augmentation progressive de cette dernière est consécutive à un apport continuellement excédentaire de substrat en rapport à la biomasse accumulée dans le réacteur. En effet, la redistribution du flux de carbone vers la voie catabolique oxydative réduit d'autant la part de carbone anabolique ce qui conduit à une production de biomasse inférieure à celle retenue pour le calcul de la consigne d'apport de substrat. Ainsi pour les deux stress, la vitesse spécifique de respiration augmente de 3 à 4,3 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Par la suite la respiration excédentaire peut être évaluée en moyenne à 4 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, supérieure à la valeur théorique calculée sur la base des rendements précédant la perturbation.

Tant que la pression est maintenue élevée dans le réacteur, la vitesse de respiration reste supérieure à la vitesse de respiration théorique. Puis dès que cette surpression est retirée, la respiration revient à une valeur proche de la valeur théorique. Par ailleurs, il n'y a pas de diminution progressive de cette vitesse de respiration, contrairement à ce que nous avons avec un pulse d'acide.

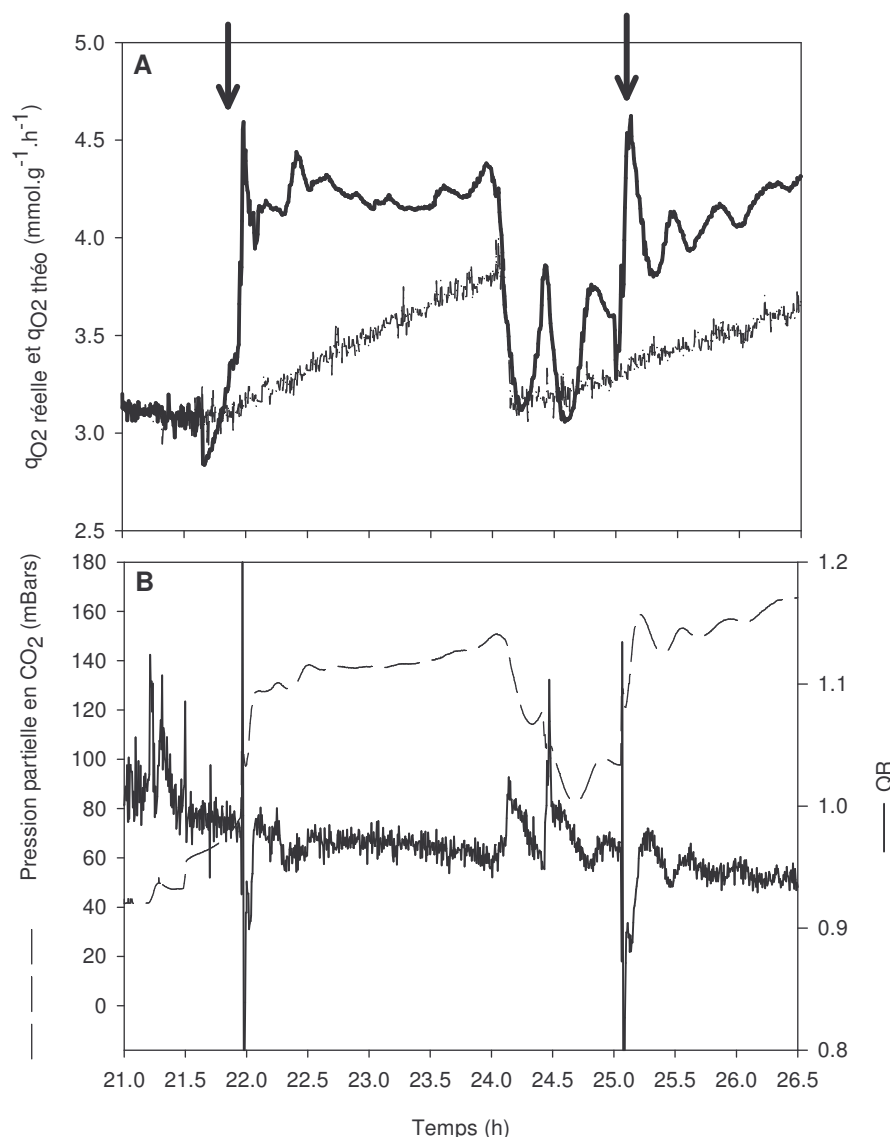


Figure 62 : Evolution en A : de la qO_2 réelle (—), de la qO_2 théorique (---) et en B de la pression partielle en CO_2 et du QR suite à deux augmentations de pression dans le réacteur indiquées par les flèches.

Cependant, au niveau quantitatif, l'amplitude de la réponse sur la vitesse spécifique de respiration à un stress CO_2 est plus faible que celle obtenue suite à un stress acide. En effet, la phase a de la respiration observée sur la culture de référence provoque un excédent de consommation d'oxygène de $0,15 \text{ mmol}.g \text{ de biomasse}^{-1}$ alors que dans le cas du CO_2 , il est de $0,05 \text{ mmol}.g \text{ de biomasse}^{-1}$. Et par ailleurs, la vitesse de respiration est multipliée par 1,3 et au minimum par 1,5 pour respectivement un choc CO_2 et un stress acide.

La chute instantanée du coefficient respiratoire lors l'accroissement de pression (Figure 62.B.) peut, comme simulé ci-dessus (Figure 60), résulter des transferts de matière gouvernés par les nouveaux gradients de potentiel chimique des espèces impliquées.

Mais le déficit sur une plage de temps de l'ordre de 10 min est représentatif du temps nécessaire à la mise en place des nouveaux gradients aptes à obtenir un régime permanent de production de dioxyde de carbone avec une concentration intracellulaire en CO₂ accrue et stabilisée. Ainsi, pour les études de stress par les acides faibles, le déficit carbone enregistré dans les phases de sur-respiration et l'évolution du coefficient respiratoire, semblables à ceux ci-dessus décrits, laissent présager d'une accumulation importante du CO₂ intracellulairement en réponse à l'accélération du catabolisme oxydatif.

En terme de capacité fermentaire, lorsque que la surpression est appliquée, les vitesses de production d'éthanol hors ligne restent identiques en absence et en présence d'acide propionique à la valeur précédant l'augmentation (respectivement 0,8 et 0,5 g d'éthanol.g⁻¹.h⁻¹, résultats non montrés). Ainsi, avec un stress CO₂, l'accélération de la respiration que l'on peut attribuer à une dissipation d'énergie non finalisée n'est pas suffisante pour induire un état d'« adaptation » à un stress acide.

III.3. Conclusions

La réponse obtenue suite à un « choc CO₂ » sur la vitesse de respiration est similaire à celle que nous avons en présence d'un acide faible, en terme qualitatif (augmentation très rapide de q_{O2}) et avait déjà été notifiée dans la littérature pour une expérimentation réalisée avec une incrémentation indicelle de la fraction molaire du CO₂ dans les gaz d'entrée (Aguilera et coll., 2005a). L'adaptation au saut de concentration en CO₂ dissous se fait immédiatement sans bascule vers le métabolisme fermentaire et sans inhibition de la croissance cellulaire. Ce dernier point est en désaccord avec les observations de la littérature qui suggèrent que la présence de CO₂ diminue fortement les rendements en biomasse (Aguilera et coll., 2005a). Dans notre cas, la réduction de la cinétique de croissance est uniquement liée à une réduction du flux carboné anabolique par l'augmentation du flux oxydatif. Toutefois, les conclusions sont à moduler en fonctions des conditions opératoires, Aguilera et coll. (2005a) réalisant leurs expérimentations en cultures continues alimentées avec une concentration en CO₂ dissous de 23 mM, concentration très supérieure à nos conditions (proches de 9 mM).

Malgré une similitude de la réponse instantanée, une nette différence de comportement est à noter dans la persistance d'un excès de respiration tant que l'action inductrice est présente (surpression). Le régime d'oscillations amorties enregistré sur la vitesse spécifique de consommation d'oxygène (particulièrement visible lors de la seconde surpression) a lieu pour la mise en place d'un mécanisme énergétique régulé afin d'atteindre un régime permanent dynamique.

L'absence d'accélération d'apport de liquide correcteur de pH qui précédemment a été corrélée à la variation de pH extracellulaire par importation du potassium montrerait que ce cation n'est pas, dans le cas du CO₂ impliqué dans les mécanismes d'homéostasie cellulaire. Cette conclusion serait en adéquation avec l'absence d'« adaptation » si, comme il en a été discuté, celui-ci est indispensable à l'obtention d'une « résistance » aux acides faibles.

Concernant l'effet du CO₂ sur la capacité fermentaire de la levure, les données de la littérature sont assez contradictoires. Une étude rapporte que la capacité fermentaire de la levure est fortement diminuée pour des cultures aérobies de type fed-batch soumises à des fortes concentrations en CO₂ dans les gaz d'entrée (Chen et Gutmanis, 1976). Ces résultats ne sont pas reproduits pour des cultures continues et d'autres auteurs suggèrent que les hétérogénéités observées de l'effet du CO₂ sur la capacité fermentaire proviennent de la différence de type de cultures (Aguilera et coll., 2005a). En effet, ces auteurs, pour des cultures réalisées en chémostat, ne notent aucune variation de la capacité fermentaire pour différentes concentrations en CO₂ dans les gaz d'entrée, résultat retrouvé dans cette étude pour les cultures de type fed-batch.

Cette étude montre que qualitativement, suite à un ajout d'acide faible, la demande énergétique requise à la restauration de l'homéostasie cellulaire se traduit par un accroissement instantané de la vitesse spécifique de production de dioxyde de carbone au niveau de la matrice mitochondriale. L'analogie de dynamique suggère que le dioxyde de carbone pourrait transitoirement s'accumuler dans la cellule et que cette rétention serait de nature à participer à l'acidification des différents compartiments cellulaires. Par la même, ce phénomène serait de nature à amplifier les seuls effets spécifiques induits par l'acide lui-même. Afin de faire abstraction de cette réponse parasite, il est indispensable de quantifier cette accumulation qui va dépendre fortement des paramètres environnementaux : pH, pression, salinité du milieu, fraction molaire dans l'environnement gazeux et dans le système diphasique. Ainsi il est nécessaire soit de caractériser le transfert liquide-gaz dans un réacteur à haute densité cellulaire et haute réactivité, soit d'avoir une analytique *in situ* pour doser les différentes espèces chimiques de dioxyde de carbone. Les études actuellement en cours dans le laboratoire (Strub, 2005) montrent, d'une part que les sondes à CO₂ actuellement disponibles possèdent des temps de réponse trop élevés (2 à 3 min) face aux constantes de temps des phénomènes à caractériser et que d'autre part, dans nos conditions d'études, le transfert du CO₂ interphasique n'est pas régi par le seul mécanisme diffusif. Dans ces conditions, une analyse plus poussée des effets du CO₂ reste délicate. Toutefois, nos précautions expérimentales à se placer dans des conditions parfaitement maîtrisées de transferts gazeux nous autorisent à une interprétation comparative des effets induits par

les acides faibles et ont permis de révéler cette problématique comme un facteur incontournable dans une procédure d'extrapolation de nos conclusions à l'échelle industrielle.

Chapitre V : Analyse intégrée des variables macrocinétiques et cellulaires

Nous avons dans un premier temps défini un milieu de culture standardisé et chimiquement défini représentatif des milieux de production à un niveau de concentration cellulaire ($40 - 80 \text{ g.L}^{-1}$) permettant de reproduire et de maîtriser les interactions dynamiques d'un système biologique-physique pouvant interférer sur les mécanismes biotiques déterminants. Pour cela, les outils de conduite de culture de type fed-batch ont été développés, seul mode de conduite permettant d'atteindre les titres en biomasse souhaités et de valider le milieu de culture. Ce dernier permet également d'obtenir des régimes physiologiques stabilisés pour lesquels l'activité anabolique (taux de croissance), le métabolisme énergétique (oxydatif et/ou oxydo-réductif) et la distribution des flux carbone (accumulation des sucres de réserves) sont parfaitement maîtrisés. Par l'étude réalisée sur l'impact du dioxyde de carbone, ce contrôle de la conduite, de la quantification précise des variables d'états ainsi que l'amplification des vitesses réactionnelles, nous a conduit à considérer l'environnement gazeux résultant de la cinétique de production et des caractéristiques de transfert de matière comme une variable interférente de la réponse cellulaire.

La démarche expérimentale repose sur l'analyse cinétique fine des réponses à des inductions impulsionnelles par les acides faibles (propionique et sorbique) répétées et réalisées pour des états physiologiques caractéristiques en terme de teneurs en substances de réserves, de capacité respiratoire maximale et de rendement énergétique obtenus pour différents taux de croissance.

L'accumulation quasi instantanée des acides lors des ajouts exogènes confirme une entrée de la forme protonée par diffusion passive et une distribution de l'acide entre la biomasse et le milieu de culture, cette répartition étant directement corrélée à la différence de pH intra et exocellulaire. Le pH intracellulaire devient ainsi une variable résultante d'une dynamique gouvernée par le gradient de potentiel chimique de la forme protonée de l'acide, par une activité biologique d'expulsion des protons et par une manière difficilement quantifiable du pouvoir tampon intracellulaire. Ce premier constat a pour conséquences premières qu'il est impossible de conclure à partir de la seule concentration équivalente d'acide ajoutée et que l'effet induit sera une fonction de la force ionique du milieu de culture. Par conséquent, pour toute autre condition environnementale et physiologique, la concentration intracellulaire en acide sera dépendante de la fraction volumique biotique, c'est à dire de la concentration cellulaire.

La mise en œuvre du mode de culture fed-batch en métabolisme oxydatif a révélé une séquence évènementielle nouvelle jusqu'à présent non décrite dans la littérature observée suite à un pulse d'acide propionique. Ainsi, la dynamique de respiration permet de prendre en compte plusieurs phénomènes qui définissent la réponse physiologique globale de la levure suite à un pulse. Des mécanismes interconnectés temporellement

prennent place pendant trois heures avant un retour à un état physiologique stabilisé. Au cours de cette période, l'analyse dynamique de la réponse cellulaire au stress acide a permis de distinguer quatre phases caractéristiques de mécanismes différenciés.

Ainsi, une première phase d'une courte durée (15 min) a pu être identifiée lorsque les cultures sont maintenues dans un métabolisme purement oxydatif associé à la croissance cellulaire ou à l'unique voie de biosynthèse des sucres de réserves (glycogène et tréhalose). Elle se caractérise par une accélération brutale de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène. Comme en atteste l'évaluation énergétique équivalente ($Y_{Acide, ATP}^*$ de 4,2 moles d'ATP.mole d'acide intracellulaire⁻¹) ainsi que l'import induit d'ions magnésium, cette phase semble correspondre à une augmentation de l'activité ATPasique indispensable à l'exportation de protons imposée pour une restauration du pH intracellulaire optimal. Cette réponse immédiate est rendue possible par une capacité respiratoire supérieure à la vitesse spécifique de consommation d'oxygène d'un métabolisme balancé et relativement d'autant plus grande que le taux de croissance est faible (Guillou, 1996). L'augmentation du pool des intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques, la conservation d'un pool basal en pyruvate, l'absence de production de métabolites spécifiques d'un métabolisme réductif (acétate, éthanol, acétaldéhyde) sont la marque d'une réorientation du flux carbone vers le catabolisme oxydatif sans toutefois outrepasser la capacité respiratoire. A cette redistribution métabolique correspond une réduction nette du flux anabolique, donc de la vitesse spécifique de croissance, sans la nécessité d'invoquer un quelconque effet inhibiteur sur cette dernière. Cette constatation doit être restreinte dans la gamme des taux de croissance retenus dans cette étude. En effet, que ce soit lors des tests de respirométrie ou lors culture en régime oxydo-réductif en excès de substrat, il semblerait que pour un flux glycolytique plus élevé, cette bascule vers un métabolisme fermentaire puisse intervenir comme en atteste une « inhibition » de la consommation spécifique d'oxygène.

Cette exportation active de protons énergétiquement dépendante, de part le mécanisme diffusif d'entrée des acides faibles, conduit à un cycle futile d'énergie et ne peut à lui seul, satisfaire le retour à une homéostasie cellulaire optimale. Durant cette première phase, se met en place une importation massive d'ions potassium qui, selon un transport de type proton - antiport électroneutre (Rodriguez-Navarro, 2000) satisfait une réaction de neutralisation de l'acide intracellulaire et se substitue à l'activité ATPasique induite.

Durant cette période de catabolisme oxydatif amplifié, une surproduction de dioxyde de carbone intervient. Le déficit carbone enregistré sur les bilans et la réduction apparente du coefficient respiratoire laissent présager d'une accumulation intracellulaire de la forme carbonatée. Cette séquestration d'un produit de la réaction, lui-même acide

faible, doit comme l'a montré l'étude spécifique sur l'accroissement brusque de la pression partielle en CO₂ participer au mécanisme d'acidification cytosolique voire mitochondrial et amplifier d'autant la réponse énergétique.

Cette phase énergétiquement dépendante n'est pas observée si par la conduite du procédé, l'apport d'accepteurs externes d'électrons est limitant et qu'un métabolisme oxydo-réductif est établi. Dans ces conditions, l'absence d'une redistribution du flux carbone anabolique vers la voie énergétique fermentaire afin de satisfaire une éventuelle demande énergétique se traduit par un abaissement plus net du pH intracellulaire, c'est à dire à une moindre accumulation intracellulaire en acide faible.

Le rôle des substances de réserves est plus hypothétique. Comme décrit dans littérature (Poilpré, 2002), leur mobilisation en tant que source de carbone additionnelle durant un régime d'oscillations spontanées ne peut être totalement écartée. Toutefois la dégradation réduite du tréhalose, osmorégulateur reconnu (Kempf et Bremer, 1998), même dans le cas d'une très forte teneur basale (comme lors d'une carence azotée), pourrait n'être le résultat que d'un mécanisme de régulation de la pression osmotique fortement augmentée par l'accumulation d'acide faible et l'import d'ions potassium et magnésium.

La seconde phase est plus dépendante de la nature de l'acide et de son devenir. Nous pouvons ainsi distinguer le comportement caractéristique d'un acide faible métabolisable et catabolisé (acide propionique) d'une réponse un acide faible non-métabolisé (acide sorbique) ou l'acide propionique en métabolisme oxydo-réductif.

La mise en place instantanée du catabolisme de l'acide propionique ainsi qu'une vitesse spécifique de consommation quasiment identique (0,12 mmol.g⁻¹.h⁻¹) quelque soit le taux de croissance ou la valeur du pH de travail corroborent l'existence d'une voie de dégradation constitutive via la voie du méthylcitrate-CoA, déjà décrite par Pronk et coll. (1994). La non dégradation de cet acide en métabolisme oxydo-réductif est liée à la répression de l'activité de l'acétyl-CoA synthase par l'éthanol accumulé (van den Berg et coll., 1996).

En situation de consommation de l'acide faible, l'excès de respiration par rapport à la vitesse spécifique de consommation d'oxygène théorique correspond à un métabolisme énergétiquement équilibré lié à la dégradation continue des sucres de réserves (glycogène et tréhalose). L'impossibilité d'estimer ou de mesurer le pH intracellulaire du fait de la cinétique de dégradation de l'acide durant cette phase ne permet pas de conclure sur la finalité de la surproduction énergétique. La teneur en potassium intracellulaire à une valeur constante de 360 mM suppose une homéostasie du pH établie ne nécessitant donc pas une dépense énergétique. Toutefois, cette valeur identifiée sur l'ensemble de l'étude comme une valeur critique pourrait correspondre à l'atteinte d'une

pression de turgescence limite qui induirait un mécanisme de régulation. Ainsi apparaîtrait un cycle d'import-export de potassium auquel serait associée la dépense énergétique constatée.

Cette implication énergétique d'origine oxydative a été également constatée dans le cas de l'acide faible non métabolisable (acide sorbique) dont l'accumulation graduelle sur un intervalle de temps beaucoup plus long permet d'estimer une évolution du pH intracellulaire jusqu'à une valeur proche des valeurs optimales admises (pH compris entre 6,8 et 7,2, Navon et coll., 1979, Nicolay et coll., 1982). Durant cette phase, les oscillations métaboliques caractérisées par des bascules cataboliques partielles et successives de production et de consommation d'éthanol, ayant pour conséquence respectivement des sorties et entrées d'acide, soutiennent l'hypothèse d'une exigence énergétique pour l'obtention d'une homéostasie stable du pH et de la pression de turgescence. Ce régime oscillatoire amorti sur la vitesse spécifique de consommation d'oxygène a été également induit par le seul effecteur CO₂ confirmant la mise en cause d'un système multiple de régulation. Pour un acide faible non métabolisé en limitation de flux de production d'énergie oxydative, il n'a pas été caractérisé de dépense énergétique additionnelle requise pour l'obtention d'un état d'équilibre établi pour un pH proche de 7 et pour une accumulation en potassium correspondant à la concentration critique précédemment définie. De cette analyse réduite à des échanges entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, il apparaît que seule l'énergie associée à la respiration serait mobilisable dans la dynamique du rétablissement de l'homéostasie cellulaire. Une variation du pH cytosolique pourrait induire la modification de la force proton motrice mitochondriale et par conséquent, soit altérerait le rendement de la phosphorylation oxydative, soit induirait des mécanismes énergétiquement dépendant afin de restaurer l'homéostasie mitochondriale.

L'étude d'un effet cumulatif d'ajout exogène (deuxième pulse d'acide sorbique) confirme que la réponse pour un rétablissement du pH intracellulaire est bornée dans nos conditions opératoires à une capacité d'accumulation de l'ion potassium jusqu'à une valeur critique voisine de 360 mM. Cette concentration en ions potassium avec la prise en compte de l'anion conjugué de l'acide faible correspondrait à un accroissement de la pression de turgescence de 400 kPa, accroissement limite admissible par la levure. Lors de cette même étude, il est également apparu que le rétablissement de l'homéostasie présentait une cinétique plus lente avec la mise en place d'une voie catabolique fermentaire, donc d'une réduction de la génération d'énergie oxydative par rapport à celle mesurée en régime purement oxydatif.

Un comportement spécifique peut être attribué à l'acide sorbique de par une compartimentation cellulaire et probablement membranaire comme décrite par Hazan et

coll. (2004) qui conférerait à cet acide un caractère inhibiteur strict pouvant interférer sur les cinétiques observées. Le régime oscillatoire pour cet acide serait entretenu par la co-existence de deux mécanismes antagonistes : une accumulation d'acide croissante liée à la neutralisation par le potassium avec une amélioration de l'homéostasie pH et un effet inhibiteur croissant intrinsèque à la molécule de l'acide sorbique.

La troisième phase n'est observable que lorsque intervient l'épuisement intracellulaire en acide faible lors d'une induction impulsionnelle ou que son taux résiduel est très faible suite à une alimentation continue limitante. Elle se caractérise par une reconstitution progressive du pool de sucres de réserves tel qu'il existait en phase de croissance en métabolisme balancé et amène un retour de l'ensemble des variables macroscopique d'état à leur valeur basale. L'élément majeur de cette phase est que, malgré l'épuisement en acide, n'intervient pas d'exportation cationique et que la diminution des teneurs intracellulaires en potassium et magnésium ne soit attribuable qu'à l'effet de dilution dans la biomasse néoformée. On doit envisager l'hypothèse, principalement pour le potassium, d'une séquestration vacuolaire compatible avec le maintien du pH intracellulaire. Cette disponibilité compartimentale justifierait l'accélération de la séquence événementielle lors d'une seconde exposition à l'acide faible.

Un des objectifs de ce travail était de pouvoir quantifier une « adaptation » potentielle de la levure aux acides faibles. L'interprétation cinétique faite du test d'« adaptation » montre l'existence d'une phase de latence pouvant résulter d'une perte de capacité fermentaire liée à l'acidification cytosolique avant la restauration d'un pH_i assurant le potentiel fermentaire du témoin. L'adaptation des cellules face à une seconde exposition à l'acide serait ainsi définie comme une réduction de ce temps nécessaire à rétablir une homéostasie optimale.

Après avoir déterminé que cette « adaptation » ne provenait pas d'une dégradation constante d'un acide faible, nous avons montré qu'elle est parfaitement corrélée à la teneur potentielle en cations disponibles, et plus particulièrement en potassium. Ces cations sont aptes à neutraliser instantanément un flux additionnel d'acide et préviennent ainsi une acidification cytosolique drastique. Il apparaît que ce n'est pas la teneur en cations elle-même qui confère l'« adaptation » mais plutôt une éventuelle répartition liée à la compartimentation. Ainsi, il a pu être démontré que la capacité fermentaire optimale est partiellement restaurée lorsque la teneur cellulaire en cations est supérieure à celle requise pour l'homéostasie du pH. Ce phénomène d'« adaptation » temporaire résulte donc d'un état transitoire découlant de la dynamique des mécanismes impliqués dans les régulations du pH intracellulaire et de la pression de

turgescence. En effet aucune adaptation n'a pu être observée lorsque la cinétique d'incorporation de l'acide est suffisamment lente pour qu'un état de régime quasi-permanent intracellulaire puisse s'établir comme décrit pour l'acide sorbique ou pour l'acide propionique en régime oxydo-réductif ou en conditions de permanente consommation de l'acide.

L'augmentation de capacité fermentaire pour les essais témoins dénote d'une meilleure réponse de cellules mises en présence d'un milieu à forte pression osmotique. Cette observation est en accord avec le rôle attribué au potassium dans l'accroissement de la pression osmotique intracellulaire.

De plus, nous avons observé que des cellules cultivées en métabolisme oxydatif ou mixte et exposées à l'acide propionique ou à l'acide sorbique, affichent une « adaptation » aux deux acides lors des tests d'évaluation de la capacité fermentaire. L'ensemble des tests croisés ainsi réalisés amène à une première constatation qui est que des cellules ayant subi un stress acide présentent une « adaptation » transitoire en présence soit du même acide soit d'un autre acide.

Chapitre VI : Analyse de la réponse transcriptomique à un pulse d'acides faibles

I. Introduction

L'essor fulgurant des études de génomique fonctionnelle, faisant suite aux avancées des projets internationaux de séquençage des génomes amorcés à la fin des années 80, suscite aujourd'hui un très grand intérêt expérimental. *S. cerevisiae* a été le premier micro-organisme eucaryote inférieur dont le génome a été entièrement séquencé (Goffeau et coll., 1996). Son génome est relativement petit, comportant un total d'environ 12,1 mégabases réparties sur 16 chromosomes nucléaires auxquels il faut rajouter le chromosome mitochondrial. Parmi les 6591 ORFs (cadres ouverts de lecture) identifiés chez *S. cerevisiae*, 4322 ORFs sont caractérisés et 1452 codent pour des protéines de fonction inconnue (Base de données SGD, www.yeastgenome.org).

Récemment, de nombreuses études réalisées chez *S. cerevisiae* ont permis d'étudier et de comparer les changements des profils d'expression de la globalité des gènes entre une condition standard de croissance et une condition de stress. Plusieurs types de stress ont ainsi été caractérisés : la pression osmotique (Rep et coll., 1999 ; Yale et Bohnert, 2001 ; Erasmus et coll., 2003), les acides faibles (Schüller et coll., 2004), le CO₂ (Aguilera et coll., 2005a), la température (Causton et coll., 2001) et une forte pression hydrostatique (Fernandes et coll., 2004). Ces études ont permis de mettre en évidence que la moitié des gènes de la levure sont impliqués dans les différentes réponses à ces changements environnementaux. Toutes ces données révèlent une signature commune à une réponse environnementale qui implique 10 % de la totalité des gènes (Causton et coll., 2001).

Notre objectif était de coupler notre analyse macroscopique à une analyse microscopique de type « puces à ADN » pour un stress acide. L'intégration de la génomique fonctionnelle en tant qu'outil d'investigation complémentaire aux techniques classiques de génies microbiologique et physiologique nous semblait importante. Nous avons aussi la volonté de réconcilier les données macrocinétiques aux données transcriptomiques. Nous souhaitons évaluer la faisabilité d'une approche intégrative regroupant les données cinétiques et transcriptomiques afin de valider certaines hypothèses sur l'identification de fonctionnalités cellulaires mobilisées dans la réponse à un stress acide.

L'originalité de notre approche dans la compréhension de la réponse physiologique à un stress acide réside dans l'analyse cinétique du changement d'expression des gènes suite à ce type de stress. Les travaux de la littérature s'intéressent principalement aux variations d'expression dues à un « choc acide », c'est-à-dire entre 5 et 20 minutes après l'ajout d'acide, sans examiner ni un effet à long terme ni les cinétiques de modifications d'expression. Or, il a été montré que ces dernières peuvent être uniquement transitoires.

Ainsi, exposer les levures pendant 10 minutes à un stress osmotique (0,4 mM de NaCl) conduit à un changement dans l'expression de 1300 gènes, alors que leur nombre est réduit à seulement 172 après une exposition de 20 minutes (Posas et coll., 2000). C'est pourquoi, nous avons décidé de suivre la dynamique de l'expression des gènes suite à un pulse d'acide afin d'identifier l'effet primaire de l'acide puis les conséquences au cours du temps.

Pour les deux études réalisées, acide propionique et sorbique en mode oxydatif, les résultats spécifiques seront exposés et discutés globalement en fonction des données de la littérature en fin de chapitre.

II. Traitement des données

Les analyses transcriptomiques fournissent des données à très forte dimensionnalité. Cela peut être un avantage ou un inconvénient car souvent, les résultats des « puces à ADN » sont limités à la production d'un catalogue de gènes sur ou sous exprimés. Pour obtenir des interprétations exploitables, des outils mathématiques sont nécessaires pour obtenir les informations pertinentes. Ainsi, la comparaison des résultats issus de plusieurs expériences – expériences permettant de suivre les variations du transcriptome au cours du temps ou de comparer plusieurs types de cultures - requiert le développement de méthodes d'analyse et d'organisation des données facilitant leur exploitation. Une méthode communément utilisée pour explorer les données est le regroupement (appelé « clustering » en anglais) présentant des profils d'expression similaires dans les expériences considérées. Ceci permet d'établir des groupes (« clusters ») de gènes co-régulés dans les conditions étudiées indépendamment de leur fonction.

II.1. Principe de l'analyse par regroupement des profils d'expression

Parmi les méthodes de regroupement notons les méthodes suivantes : le regroupement hiérarchique, le Self Organizing Maps, le k-means clustering, l'Analyse en Composantes Principales (ACP), le Support Vector Machines. Ces types de regroupements sont utiles pour plusieurs raisons :

- Les gènes impliqués dans une même fonction cellulaire sont susceptibles d'être exprimés de manière coordonnée. Notamment, plusieurs études établissent que des protéines interagissant entre elles ou appartenant à un même complexe présentent des profils d'expression corrélés (Jansen et coll., 2002). Des hypothèses sur la fonction non caractérisée de gènes peuvent être donc émises en se référant aux fonctions connues des autres gènes co-régulés (Eisen, 1998).

- De même, les gènes dont les profils d'expression sont similaires sont susceptibles de dépendre d'un même mécanisme de régulation transcriptionnelle. Ceci

peut faciliter la recherche de motifs de séquence consensus dans les promoteurs de ces gènes et des facteurs de transcription dont ils sont les cibles.

- Certains groupes de gènes peuvent être caractéristiques d'une réponse à des conditions expérimentales spécifiques. Des clusters de gènes « signatures » peuvent être ainsi définis pour caractériser un effet particulier ou un état physiologique de la cellule (par exemple, gènes « signatures » spécifiquement induits lors de dommages à l'ADN, Gasch et coll., 2001).

II.2. Regroupement hiérarchique utilisé

Dans notre étude, la composante temps devient une variable supplémentaire pour le regroupement des informations. Mais le nombre trop réduit de l'échantillonnage sur une large durée, interdit l'interpolation des évolutions par une analyse selon la base de temps de l'observation macroscopique et par conséquent l'utilisation de certaines méthodes ci-dessus décrites. Afin d'intégrer les deux niveaux d'observation, la stratégie a été de rechercher les similitudes de variation temporelle de l'amplitude d'expression définissant des classes dont les caractéristiques en terme de fonctionnalités et/ou de localisations cellulaires pertinentes seront recherchées. Dans un dernier temps, on recherchera, pour chaque classe, les corrélations existantes entre son profil d'évolution et celui des variables macroscopiques et cellulaires afin d'identifier les fonctions et localisations cellulaires qui les déterminent.

Dans un premier temps, pour organiser des données d'expression de gènes, il s'agit de grouper l'ensemble des gènes qui ont des profils semblables d'expression. La première étape consiste donc à adopter une description mathématique de similitude. Différentes métriques sont utilisées pour calculer la distance entre les profils d'expression comme le coefficient de Pearson, la distance euclidienne, la covariance, la distance de Manhattan. Le coefficient de corrélation de Pearson est l'un des plus couramment utilisé. Il est égal à 1 si les deux profils sont identiques, à 0 s'ils sont indépendant et à -1 s'ils sont exactement opposés. Il permet d'évaluer le degré de similitude entre les profils d'expression de deux gènes en fonction de l'évolution du profil sans tenir compte de l'amplitude de la variation (c'est-à-dire que deux gènes co-régulés induits exactement au même moment seront considérés similaires même si l'un est exprimé à un niveau plus élevé que l'autre).

Les gènes sont comparés deux à deux en fonction du degré de similitude entre leurs profils d'expression. Les gènes montrant la plus faible distance entre leurs profils sont groupés sous un « nœud » (« node »). Un profil représentatif du groupe de gènes est attribué à ce nœud (profil moyen du groupe dans la méthode dite « average linkage », profil du gène le plus éloigné du groupe voisin pour la « complete linkage » ou le plus proche pour la « single linkage »). Le nœud est ensuite lui-même comparé à un

autre gène ou un autre nœud. Ainsi, de proche en proche, les gènes sont ordonnés de manière hiérarchique dans un dendrogramme.

Il existe deux types de classification, la classification supervisée et celle non supervisée. La première suppose que nous connaissons à *priori* le nombre de groupes dans lesquels nous souhaitons classer les données alors que la seconde est réalisée sans aucune connaissance de ce nombre, le découpage en classes est réalisé à partir d'un choix d'un seuil arbitraire.

Nous avons décidé d'utiliser la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) en imposant le nombre de groupes. La CAH est une méthode itérative fondée sur des regroupements progressifs. Dans la mesure où l'intérêt est d'obtenir des groupes les plus contrastés possibles la méthode du « complete linkage » et la méthode de Ward sont les mieux adaptées. La première repose sur la distance entre deux groupes qui est donnée par celle entre les objets les plus éloignés dans les groupes et la seconde est basée sur la minimisation de la variance intra-groupe. Nous avons choisi d'utiliser dans cette étude l'algorithme de Ward qui consiste à regrouper de proche en proche les gènes dont l'agrégation entraînera la plus petite perte d'inertie. Elle va donc constituer des classes d'individus se ressemblant le plus. Puis, progressivement, elle va (au cours des itérations successives) intégrer de plus en plus d'individus dans une même classe. Ainsi, à la dernière itération, une seule classe comportant l'ensemble des individus est obtenue.

Il existe plusieurs logiciels permettant d'effectuer les analyses de regroupements, certains sont en libre accès sur Internet (Genesis, J-express) ou sous licence (Genespring). Nous avons choisi de traiter ces données, sous une application Matlab développée au laboratoire. Le résultat obtenu se présente sous la forme d'un dendrogramme, arbre de construction des classes à partir duquel il sera possible de définir les regroupements les plus intéressants (Figure 63). Les data à classer sont les gènes dont l'amplitude d'expression est exprimée en fonction de l'échantillonnage, donc du temps.

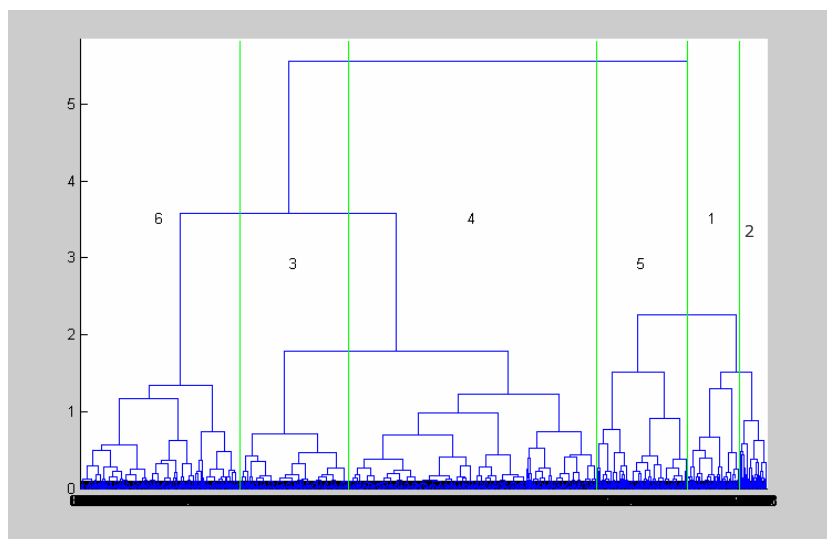


Figure 63 : Exemple de représentation graphique obtenue pour la classification supervisée des gènes ascendante hiérarchique avec l'application Matlab (amplitude d'expression en fonction du temps).

La classification présentée ci-dessus ne tient pas compte des catégories fonctionnelles des gènes. Une fois la classification réalisée, nous leur avons affecté la ou les fonctions correspondantes en se basant sur les 18 catégories fonctionnelles définies par la Munich Information Center for Protein Sequences Yeast Genome Database (<http://mips.gsf.de/proj/yeast>).

Une fois cette classification de gènes réalisée, il s'agit de rechercher une corrélation entre les variables macroscopiques qui nous paraissaient significatives (réserves, respiration, cations...) et les classes de gènes obtenues par le précédent traitement. Pour cela, nous avons utilisé un critère de corrélation (Pearson) qui va permettre de confirmer ou d'infirmer une corrélation possible entre une classe de gènes et une ou plusieurs variables macroscopiques. Cette analyse a été effectuée avec un logiciel développé sous Matlab qui retourne une matrice de corrélation entre les classes de gènes et les variables macroscopiques. L'ensemble des outils de traitement de l'information est présenté sur la figure 64.

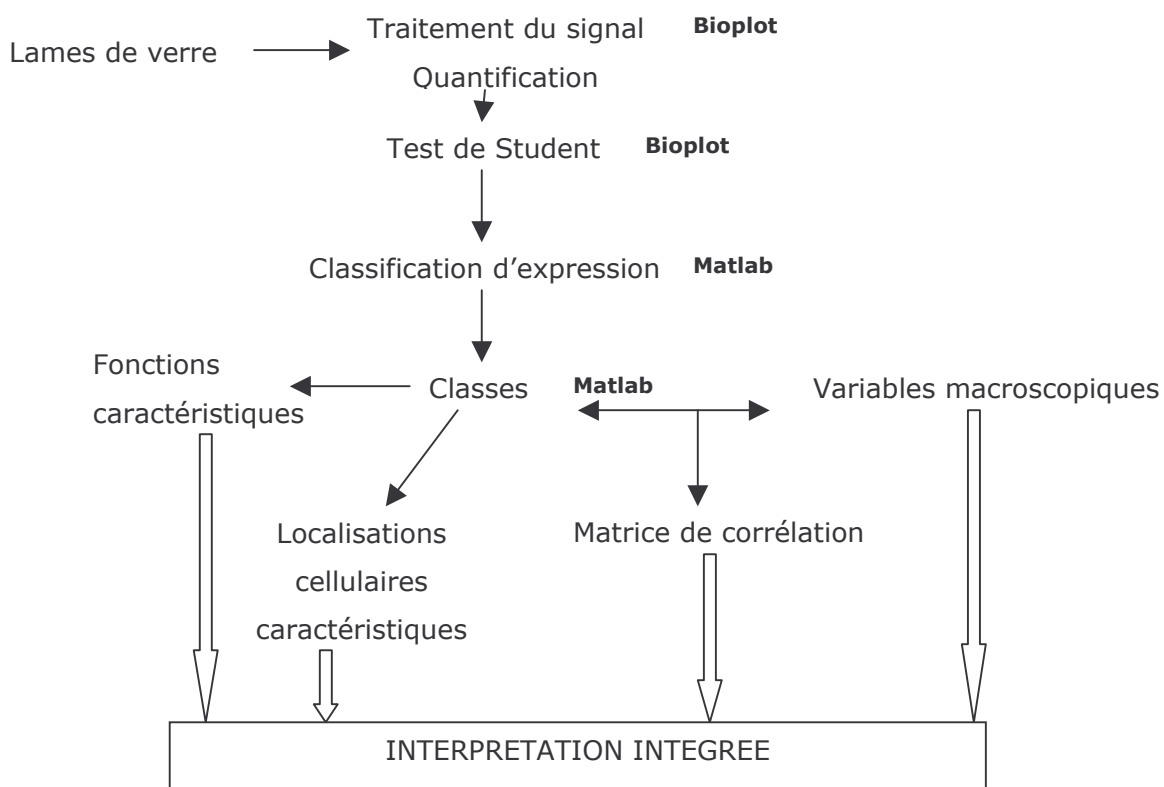


Figure 64 : Représentation schématique des différents traitements et de la démarche appliqués aux analyses transcriptomiques.

III. Analyse de la réponse à l'acide propionique

Pour l'étude du transcriptome, nous avons utilisé des lames de verre selon les protocoles établis par la plateforme transcriptome Biopuces de la g  nop  le Toulouse Midi-Pyrénées (cf. § III.11., Matériel et Méthodes). Nous avons effectué une étude globale des changements d'expression au cours du temps, en utilisant comme référence un échantillon prélevé pour un métabolisme stabilisé en métabolisme balancé depuis plus de 3 heures. Les prélèvements servant à l'étude du stress acide sont réalisés à des temps précis de la culture suite au pulse d'acide dans le réacteur (5, 60, 90, 205 min). Ces prélèvements correspondent à des comportements physiologiques clairement identifiés lors nos cultures. Les expériences sont répétées afin d'appliquer un test de Student. Seuls sont jugés significativement différents les gènes dont la probabilité associée est inférieure à 5 %. Les ARN messagers de l'échantillon de référence ont été extraits et marqués avec le fluorochrome Cy3 (vert) et sont co-hybridés avec les échantillons de la cinétique (marqués au Cy5, rouge). Les répétitions sont effectuées sur un même échantillon sur lequel nous avons choisi d'effectuer le « dye swap », c'est-à-dire que nous avons réalisé un couple de lames sur lesquelles les deux échantillons

hybridés ont été marqués en inversant les fluorochromes. En effet, il a été observé un problème important associé au marquage qui est dû à une différence d'incorporation des colorants lors de la phase de marquage. Ce phénomène est minimisé en utilisant le « dye-swap » comme décrit par Wei et coll., 2001. Ce type de traitement a été effectué pour toutes les analyses transcriptomiques décrites dans ce paragraphe. Nous définirons les gènes sous ou sur exprimés par rapport à la référence définie ci-dessus. Le seuil d'expression a été fixé à moins de 0,6 pour les gènes sous exprimés et à plus de 1,5 pour les surexprimés.

Ces résultats bruts n'ont pas été exprimés en variation d'expression qui suppose la connaissance du turn-over (durée de vie) et de l'expression globale des transcrits et la prise en compte du facteur de dilution dans la biomasse néo-formée sur la durée de l'expérience.

III.1. Analyse préliminaire : validation de l'échantillonnage

Dans cette étude préliminaire, il s'agit de vérifier le choix de l'échantillonnage. En effet, il a été choisi en fonction des phases précédemment définies par la dynamique de respiration. Nous souhaitons savoir s'il est susceptible de fournir une information transcriptomique exploitable selon le traitement décrit ci-dessus, et en particulier pour des phases durant lesquelles un métabolisme non perturbé est macroscopiquement rétabli.

Dans un premier temps, l'analyse transcriptomique a été réalisée sur la culture « modèle » (pH 5, μ 0,1 h⁻¹) avec le prélèvement servant de référence réalisé en métabolisme stabilisé depuis 3 heures en absence d'acide. D'autres prélèvements ont été effectués 1,5 h (n°2) et 4,2 h (n°3) après le premier pulse et 1,5 h (n°4) après le second pulse d'acide propionique (6,7 mM). Ces prélèvements correspondent au niveau des variables macroscopiques pour le prélèvement n°2 au début de la phase c et à une forte capacité fermentaire de la levure en présence d'acide, pour le prélèvement n°3 à la phase d de la respiration avec une perte de l'adaptation à l'acide propionique et le prélèvement n°4 correspond à la phase c de la respiration et à une capacité fermentaire élevée suite au second pulse d'acide (Tableau 25). Les échantillons n°2 et n°4 correspondent au même état physiologique (phase de respiration identique et capacité fermentaire élevée) avec pour le n°4 des cellules exposées à l'acide deux fois successives. Notre objectif était ainsi de vérifier, à partir de l'analyse transcriptomique, le retour à la normale des variables macroscopiques 4 heures après le pulse si celui-ci existe (prélèvement n°3), d'identifier une différence d'expression transcriptomique possible entre des cellules « adaptées » et « non adaptées » à l'acide propionique et de différencier la réponses des cellules ayant subi un ou deux pulses d'acide.

Tableau 25 : Récapitulatif du nombre de gènes sous et surexprimés pour différents prélèvements suite à deux pulses d'acide propionique pour la culture de référence.

Nombre de gènes	Durée		Durée
	après le premier pulse		après le second pulse
	90 min	205 min	90 min
sous exprimés	187	13	65
surexprimés	123	23	26
Total	310	36	91
Phase de respiration	c	d	c
Capacité fermentaire	élevée	« normale »	élevée

Les résultats montrent que 90 minutes après le pulse d'acide propionique, l'expression de plusieurs gènes n'est toujours pas revenue au niveau de référence (Tableau 25). En revanche, lorsque les variables macroscopiques sont revenues à un niveau nominal correspondant à un métabolisme balancé, l'expression des gènes est globalement revenue à la normale avec 0,6 % de la totalité des gènes dont l'expression diffère de la référence. Nous pouvons donc conclure que le retour à la normale, aussi bien des variables macroscopiques observées sur nos cultures que des variables microscopiques, correspond à un état physiologique identique à celui précédant le stress.

Dans l'échantillon n°4 (90 min après le second pulse), le nombre de gènes dont l'expression varie est moins important que pour l'échantillon 2. Ce résultat pourrait indiquer soit que la première exposition à l'acide dote la levure d'un potentiel réduisant le nombre de fonctionnalités à contrôler lors d'une exposition ultérieure soit, simplement, que la réponse ait été plus précoce suite à cet acquis. Néanmoins, 8 gènes dont l'expression varie pour ces deux conditions sont communs aux échantillons n°2 et n°4 et normalement exprimés dans l'échantillon n°3 (Tableau 26). Quatre de ces gènes sont surexprimés et appartiennent à la catégorie fonctionnelle « Energie » dont deux participent au métabolisme des réserves mais dont la fonction dans la cellule n'est pas à ce jour réellement connue (*GIP2* et *FSP2*).

Tableau 26 : Liste des gènes communs entre les prélèvements 2 et 4 avec leur ratio d'expression par rapport à la référence, leur fonction et leur catégorie fonctionnelle.

gène	ratio n°2	ratio n°3	ratio n°4	Protéine	Catégorie fonctionnelle
<i>BIO3</i>	0,4	0,71	0,45	aminotransférase	Métabolisme
<i>FUI1</i>	0,43	0,94	0,53	Uridine perméase	Métabolisme / Transport
<i>YDR210c-c</i>	0,51	0,8	0,48	Protéine TY1A	Eléments transposables
<i>YKR040c</i>	0,53	0,88	0,52	Inconnue	Inconnue
<i>MAM33</i>	1,65	1,3	1,94	Protéine de la matrice mitochondriale	Energie
<i>GIP2</i>	1,77	1,13	1,71	Phosphatase	Energie
<i>FSP2</i>	2,11	0,99	1,98	α - glucosidase	Energie
<i>HXK1</i>	2,59	1,3	4,09	Hexokinase 1	Energie

Ce même type d'analyse a été effectué pour la culture en carence azote suite au pulse d'acide propionique. Il s'avère que 90 minutes après le pulse, 24 gènes présentent une expression différente de la condition avant le pulse d'acide, ce qui semble corroborer nos résultats précédents en indiquant que l'effet de l'acide propionique n'est que transitoire (Tableau 27). En revanche, concernant la culture avec les pulses d'acide sorbique, le nombre de gènes dont l'expression varie augmente avec la durée de la culture, montrant ainsi la pérennité de l'effet de l'acide sorbique.

Tableau 27 : Nombre de gènes dont l'expression varie suite à un pulse d'acide propionique en carence azotée et suite à un pulse d'acide sorbique en métabolisme oxydatif pur.

Culture	Nombre de gènes	Durée après le pulse			
		5 min	60 min	90 min	205 min
Carence azote	Sous exprimés	22		11	
	Surexprimés	89		13	
Acide sorbique	Sous exprimés	7	21		9
	Surexprimés	53	54		106

Un nombre assez faible de gènes subissent une variation d'expression suite au stress à l'acide que ce soit sorbique ou propionique. Ces résultats sont proches de ceux de Schüller et coll. (2004) puisque suite à une exposition de 20 minutes à 8 mM d'acide sorbique, ils observent une surexpression de 100 gènes et une sous expression de plus de 200 gènes. En revanche, nous sommes loin des 900 gènes qui sont définis comme la réponse commune de la cellule à tout type de stress comme défini par Causton et coll., 2001. Néanmoins, nos conclusions mériteraient une confirmation par des répétitions sur une même culture et pour des cultures similaires en terme de conduite et d'induction différentes.

III.2. Analyse de la cinétique transcriptomique

Par rapport aux observations réalisées dans cette analyse préliminaire, il apparaît que le suivi de la cinétique d'expression des gènes après un pulse d'acide propionique nécessite des prélèvements plus ciblés en rapport aux dynamiques macroscopiques. Pour une seconde expérimentation de référence (pH 5 et μ 0,1 h⁻¹), les temps de prélèvements réalisés sont présentés sur la figure 65. Le but était de quantifier dans un premier temps l'effet primaire de l'acide au niveau transcriptionnel (instantanément au pulse) ainsi que d'éventuels effets secondaires. Chacun des prélèvements pour l'analyse transcriptomique (5, 30, 90 et 205 min) correspond à une phase particulière de la respiration décrite dans le paragraphe III.2., chapitre II, Résultats (phases a, b, c et d).

Parmi les gènes qui présentent un profil d'expression différent de la référence, les facteurs d'induction et de répression sont compris respectivement entre 0,1 et 0,6 et entre 1,5 et 5. Le nombre total (98) de gènes présentant un changement d'expression instantanément suite au pulse d'acide propionique reste encore relativement faible par rapport aux données de la littérature (180 pour de Nobel et coll., 2001 et plus de 600 pour Causton et coll., 2001^o). Globalement, il est intéressant de noter que le nombre de gènes sous exprimés est 3 fois supérieur au nombre de gènes surexprimés. Ces résultats confirment les observations de Gasch et coll. (2000) qui ont noté qu'un stress environnemental (pression osmotique, pH, température,...) provoque la répression de deux fois plus de gènes que ceux qui subissent une augmentation d'expression.

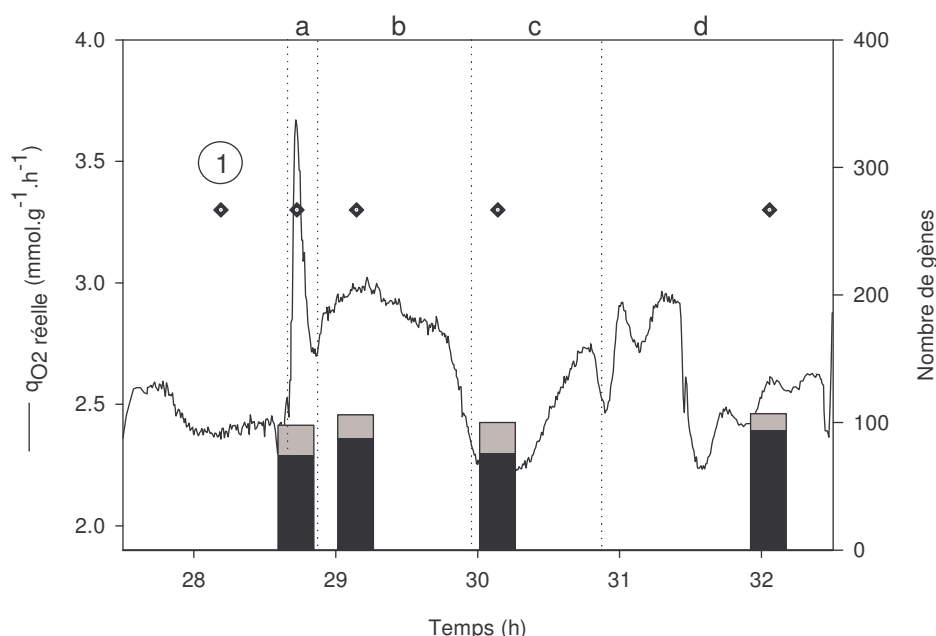


Figure 65 : Prélèvements effectués pour l'analyse transcriptomique (♦), q_{O_2} réelle et nombres de gènes sous et surexprimés concernant la culture de référence avec l'échantillon 1 pris comme référence. Avec ■ gènes sous exprimés et ■ gènes surexprimés.

Pour chaque prélèvement effectué, l'expression d'une centaine de gènes varie par rapport au prélèvement de référence, résultat quantitativement différent de celui obtenu en étude préliminaire. Malgré la maîtrise des conditions de culture argumentée par la cinétique des variables macroscopiques et intracellulaires, le premier constat est la vérification d'une forte variabilité de la réponse transcriptomique aux modifications environnementales mineures, variabilité qui, néanmoins, n'affecte pas la réponse « macroscopique » physiologique. En particulier, le nombre important de gènes sélectionné pour la phase d, comparativement à l'étude préliminaire, est probablement imputable à une insuffisance vitaminique décelée et immédiatement supplémentée à la 31^{ème} heure de culture.

III.2.1. Réponse primaire à l'acide

Dans un premier temps, l'analyse à la réponse primaire de la levure au « choc » acide, 5 minutes après le pulse, portera sur la réponse absolue des gènes significativement identifiés indépendamment des variables physiologiques. Les 98 gènes qui subissent une variation d'expression peuvent être répartis en 6 catégories principales dont la plus importante correspond à des protéines de fonction inconnue (42 %), ensuite viennent le métabolisme (20 %), le transport cellulaire (16 %), la transcription (10 %) et les défenses cellulaires (9 %) (Figure 66).

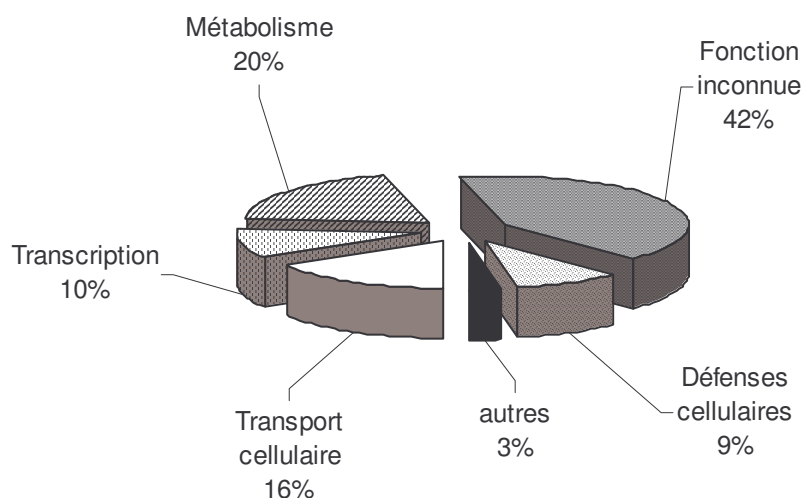


Figure 66 : Répartition fonctionnelle des gènes subissant une variation d'expression instantanément (5 min) au pulse d'acide propionique pour la culture de référence.

Pour les gènes du métabolisme, la majorité est sous exprimée mais aucune sous catégorie fonctionnelle précise n'apparaît clairement. La faible proportion de ces gènes en rapport au nombre total (respectivement 16 et 1509) semble indiquer que la redistribution immédiate des flux carbone expérimentalement observés n'exige pas un

contrôle génique des voies cataboliques et est sous le seul contrôle cinétique métabolique.

Concernant les transporteurs cellulaires, 5 gènes surexprimés ont retenu notre attention. Trois de ces gènes appartiennent à des transporteurs de la membrane plasmique : *AZR1*, *PDR12*, *TRK1*. Ils codent respectivement pour un transporteur impliqué dans la résistance aux drogues (Tenreiro et coll., 2000), un transporteur d'acides organiques (Holyoak et coll., 1999) et un transporteur de potassium (Gaber et coll., 1988). Les deux premiers sont largement décrits dans la littérature comme intervenant suite à un stress acide (Tenreiro et coll., 2000 ; Piper et coll., 1998). Les deux autres gènes codant pour des transporteurs sont *PPA1*, transporteur vacuolaire et *MST28*, participant au transport vésiculaire (Sandmann et coll., 2003). Le gène *PPA1* code pour une ATPase vacuolaire qui intervient dans le transport des cations et appartenant à la famille des pompes à protons ATP-dépendantes qui sont responsables de l'acidification des compartiments intracellulaires chez les cellules eucaryotes inférieurs (Forgac, 1999).

Concernant la catégorie fonctionnelle « défenses cellulaires », trois gènes surexprimés apparaissent intéressants : *AZR1*, *GRE2* et *LRP1*. Le premier est déjà cité dans le précédent paragraphe, *GRE2* code pour une méthylglyoxal réductase et elle intervient dans la réponse à un stress osmotique ou un stress pH (Garay-Arroyo et Covarrubias, 1999). Le gène *LRP1* code pour une protéine impliquée dans la régulation de la recombinaison et de la réparation de l'ADN.

III.2.2. Analyse cinétique de l'expression

Pour analyser la cinétique de l'analyse transcriptomique sur les 4 prélèvements effectués, nous retiendrons l'ensemble des gènes dont l'expression varie au moins une fois lors des quatre prélèvements en se basant sur un ratio inférieur à 0,6 ou supérieur à 1,5. Les 872 gènes sélectionnés, dont 32 % sont de fonction inconnue, se répartissent principalement dans 6 catégories : le métabolisme, le transport cellulaire, le devenir des protéines, la transcription, l'énergétique cellulaire et les défenses cellulaires (Figure 67).

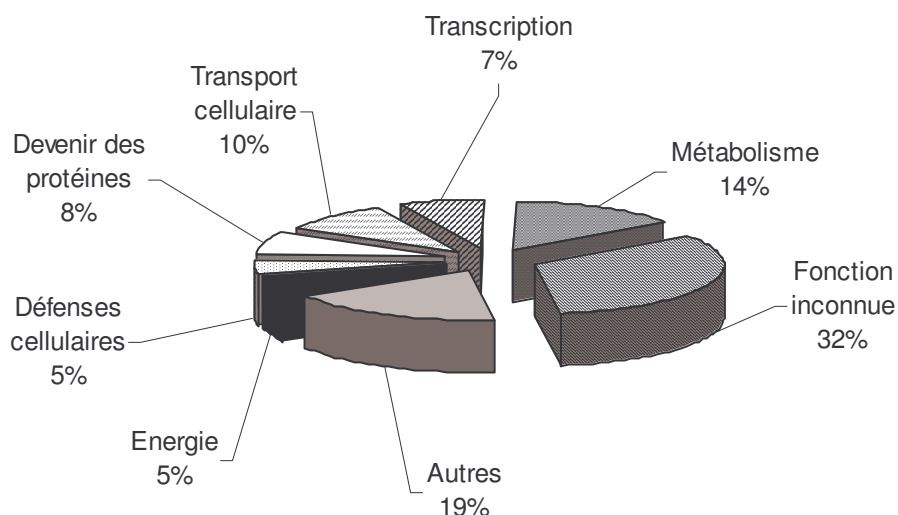


Figure 67 : Répartition fonctionnelle des gènes subissant une variation d'expression lors de l'analyse de la cinétique suite au pulse d'acide propionique pour la culture de référence.

21 gènes de la cinétique appartiennent à la sous-catégorie fonctionnelle « transport des cations ». Parmi ces gènes, 4 surexprimés sont localisés au niveau de la vacuole : *VMA10*, *VMA5*, *PPA1* et *BPT1*. Les trois premiers gènes codent pour des H⁺-ATPases. Le gène *BPT1* code un transporteur de la membrane vacuolaire de type ABC (Sharma et coll., 2002). Il contribue à la séquestration vacuolaire de composés toxiques pour la cellule tels que le cadmium.

Un exemple de la difficulté d'interprétation est donné, particulièrement pour le métabolisme et l'énergétique, par l'examen relatif aux enzymes du cycle de Krebs pour lesquelles l'évolution cinétique est proche et dont 5 présentent une augmentation significative de leur niveau d'expression (Figure 68). L'évolution cinétique paraît être cohérente avec la variation des pools intracellulaires des acides du cycle TCA ainsi que de l'augmentation du flux de carbone oxydatif et le retour des niveaux d'expression de toutes les enzymes à une valeur proche de la valeur de référence 205 minutes après le pulse d'acide est en accord avec la restauration d'un métabolisme balancé. (cf. § III.9.4., chapitre II, Résultats).

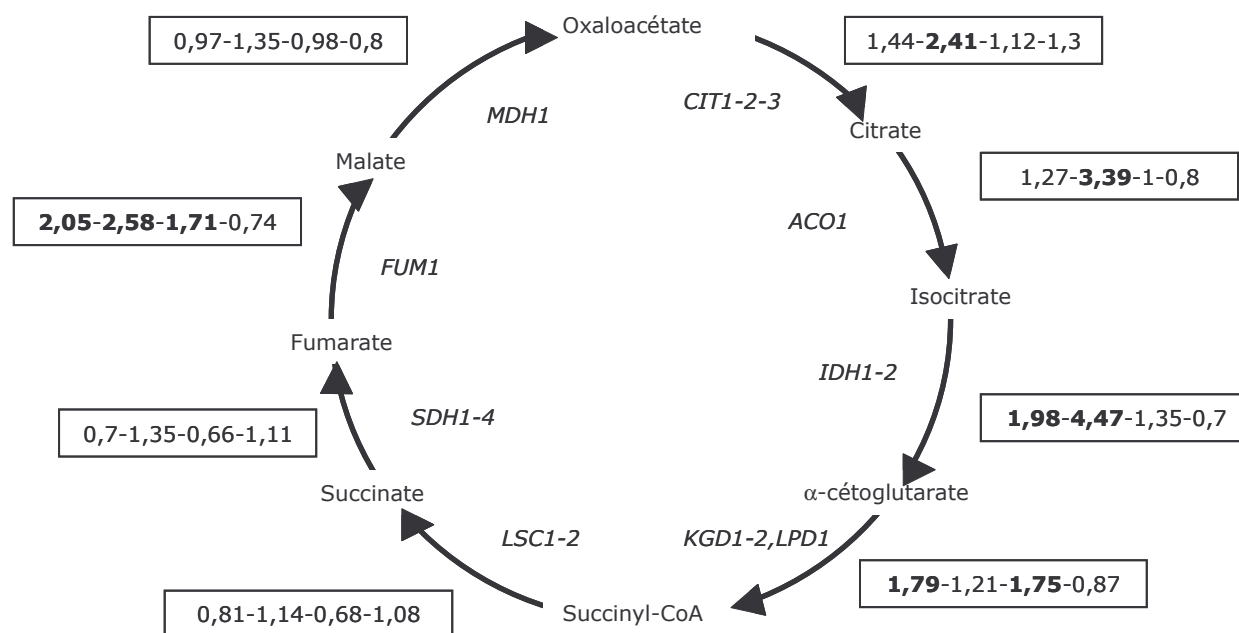


Figure 68 : Cinétique des niveaux d'expression des principales enzymes du cycle de Krebs versus l'expression de la référence.

Par ailleurs, 80 % des 34 gènes de la cinétique associés à la sous catégorie fonctionnelle du métabolisme des acides aminés voient leur expression significativement sous exprimée et 21 gènes de la sous catégorie fonctionnelle respiration (énergie) sont pour la plupart sous exprimés.

La prise en compte de tous les contrôles (métabolites, régulation, durée de vie des activités enzymatiques,...), non accessibles dans notre cas et exigés pour un raisonnement logique nous a conduit à tester une analyse statistique afin de réduire les cibles d'analyse à des fonctionnalités et/ou à des localisations cellulaires émergentes.

III.2.3. Analyse statistique

Les données transcriptomiques de la cinétique ont donc été traitées sous l'application Matlab avec le traitement statistique décrit dans le paragraphe II. Le nombre de classes retenu est le nombre le plus grand associant à chacune des classes un nombre minimum de fonctionnalités catégorielles compatible avec le test d'hypothèse du χ^2 retenu. Les 872 gènes sont ainsi répartis en 6 classes comme décrit dans le tableau 28 et les profils d'expression de ces gènes au cours des prélèvements sont répartis selon la figure 69. Ces classes diffèrent à la fois par leur profil moyen mais aussi pour des profils voisins, les classes diffèrent par leur dispersion. Par exemple, les classes n°1 et n°6 montrent globalement un même profil d'expression mais la classe 6 affiche une plus importante dispersion que la classe n°1. On notera également une grande dispersion de la classe n°2 contrairement à la classe n°4 qui présente une forte homogénéité pour de faibles variations d'amplitude.

Tableau 28 : Répartition des gènes, des catégories fonctionnelles, des localisations et du seuil de confiance de similitude respectif χ^2_{seuil} pour les différentes classes (acide propionique).

Classe	1	2	3	4	5	6	Total
Nombres de gènes	128	40	161	254	98	191	872
Catégories fonctionnelles	202	71	306	384	156	324	1443
χ^2_{seuil} /Fonction	0,3%	61,8%	0,6%	45,1%	0,0%	13,5%	0,0%
Localisations cellulaires	144	45	212	306	119	216	843
χ^2_{seuil} /Localisation	0,0%	18,5%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

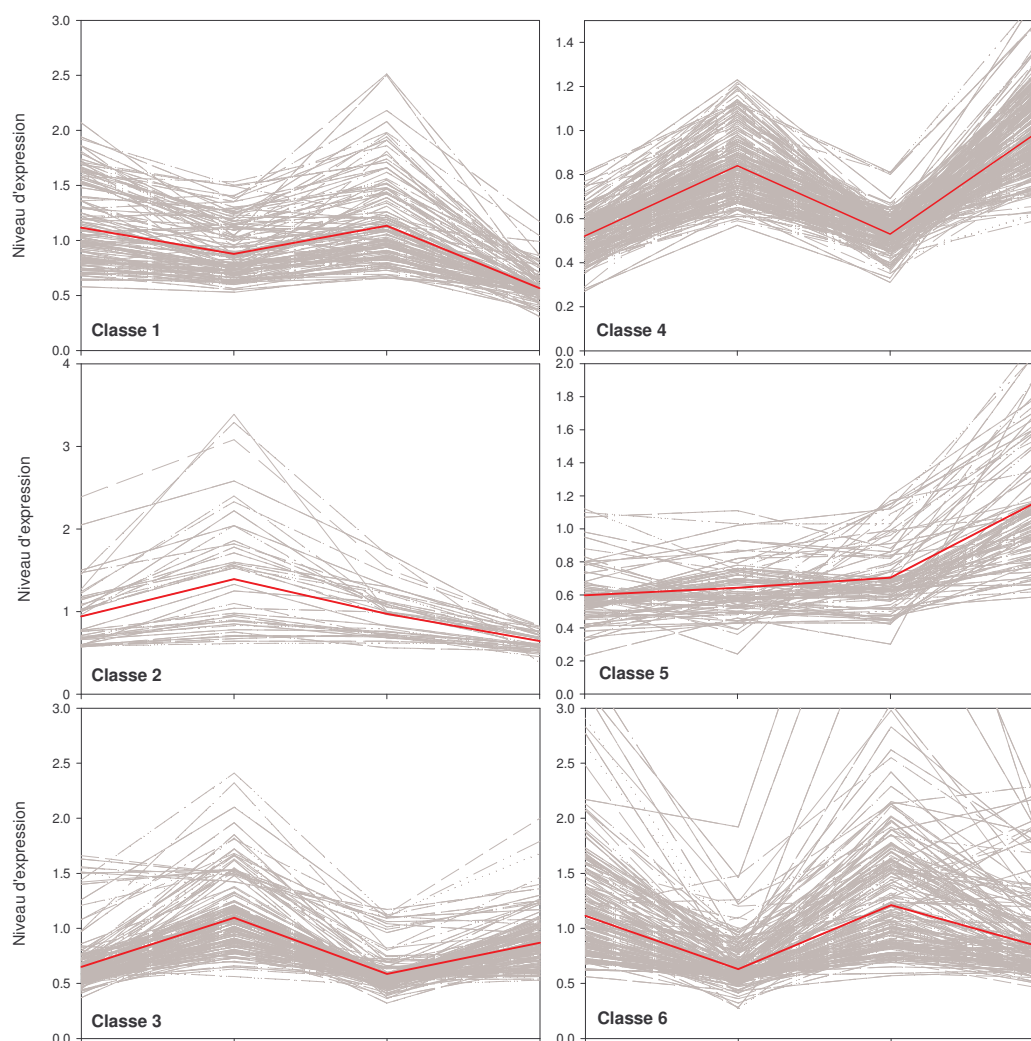


Figure 69 : Profils d'expression des gènes dans les différentes classes après traitement sous l'application Matlab. Le profil d'expression en noir représente la moyenne du profil de l'expression pour chaque classe.

La base de données MIPS fournit les catégories fonctionnelles associées aux gènes (Tableau 29). Nous avons ensuite pour chaque classe recherché les catégories fonctionnelles associées (Tableau 30) et dont la représentativité par classes est

présentée dans le tableau 31. Il s'agit de rechercher si une classe, caractérisée par sa cinétique est également déterminée par une catégorie fonctionnelle qui deviendrait une cible physiologique si une corrélation à un comportement macroscopique peut être établi.

Tableau 29 : Description des différentes catégories fonctionnelles définies par la base de données MIPS (<http://mips.gsf.de>).

Catégorie fonctionnelle	Description
Eléments transposables	Transposons, protéines impliquées dans le mouvement des transposons
Régulation de l'activité protéique	Mécanismes et cibles de régulation
Protéines nécessitant des cofacteurs	Protéines structurales ou catalytiques
Communication cellulaire	Mécanismes de transduction du signal
Energie	Glycolyse, respiration, TCA, fermentation, réserves, acides gras
Défenses cellulaires	Réponse à un stress, résistance, détoxification
Interaction avec l'environnement cellulaire	Homéostasie ionique, adhésion cellulaire
Différenciation cellulaire	x
Synthèse de protéines	Biogenèse des ribosomes, traduction, contrôle traductionnel
Biogenèse de composants cellulaires	Paroi cellulaire, cytosol, noyau...
Devenir des protéines	Repliement, modifications, destination des protéines
Cycle cellulaire	Méiose, mitose
Transport cellulaire	Transport des substrats, des ions, facilitation du transport
Transcription	Synthèse, modification, et traitement des ARN
Métabolisme	Métabolisme des acides aminés, azote, lipides, phosphate, carbohydrates
Fonction inconnue	x

Tableau 30 : Représentativité de chaque catégorie fonctionnelle pour chaque classe et pour le génome complet.

Catégorie fonctionnelle	Classe						génom
	1	2	3	4	5	6	
Eléments transposables	0	0	0	2	0	1	32
Régulation de l'activité protéique	3	2	4	8	2	8	240
Protéines nécessitant des cofacteurs	13	7	30	35	8	25	1038
Communication cellulaire	3	3	2	6	0	3	225
Energie	5	4	19	14	11	10	366
Défenses cellulaires	4	4	12	19	8	15	553
Interaction avec l'environnement cellulaire	6	1	14	15	7	10	460
Différenciation cellulaire	11	1	8	9	4	6	430
Synthèse de protéines	15	2	18	9	1	10	472
Biogenèse de composants cellulaires	21	3	16	20	5	17	857
Devenir des protéines	13	3	22	32	6	24	1089
Cycle cellulaire	11	5	22	27	8	22	1006
Transport cellulaire	13	3	26	42	17	26	1035
Transcription	10	6	18	24	10	28	1065
Métabolisme	20	12	50	54	20	34	1506
Fonction inconnue	54	15	45	68	49	85	2239

III.2.3.a. Analyse des catégories fonctionnelles

Les catégories fonctionnelles étant représentées par une fréquence différente dans le génome (par exemple, le métabolisme regroupe 1507 gènes alors que l'énergie ne représente que 367 gènes), notre étude ne pouvait pas se limiter à la fréquence d'apparition des catégories dans chaque classe. Pour cela, il nous a fallu comparer la fréquence d'une catégorie donnée dans une même classe à la fréquence de la catégorie dans le génome entier (Tableau 30). Le test d'hypothèse du khi deux retenu nous permet tester si la distribution des catégories au sein d'une classe est significativement différente de la distribution dans le génome ce qui définit l'hypothèse alternative. L'évaluation de ce test se définit de la manière suivante :

Soit Y_i^n la fréquence d'une catégorie fonctionnelle i pour une classe n et $Y_i^{\text{génom}}$ la fréquence d'une catégorie fonctionnelle i pour le génome, N_i le l'effectif de la classe i , le

calcul de la valeur du Khi² est égal à :
$$\chi^2 = \sum_i \frac{(Y_i^n \cdot N_i - Y_i^{\text{génom}} \cdot N_i)^2}{Y_i^{\text{génom}} \cdot N_i} = N_i \cdot \sum_i \frac{(Y_i^n - Y_i^{\text{génom}})^2}{Y_i^{\text{génom}}}$$

Avec un degré de liberté égal à (nombre de ligne -1), l'évaluation du test sera donnée par le calcul du seuil de confiance de similitude χ_{seuil}^2 représentant la probabilité de rejet de l'hypothèse alternative.

Ce seuil de confiance de similitude permet de savoir si une classe est statistiquement définie par une expression (ou une mesure) aléatoire des gènes selon la fréquence d'apparition des fonctions sur le génome. Ainsi pour l'ensemble des gènes (872), la répartition est significativement différente de celle attendu d'une réponse statistique de la globalité du génome. Selon ces valeurs (Tableau 28), la classe n°2 ($\chi^2_{seuil} = 62\%$) et éventuellement la classe n°4 ($\chi^2_{seuil} = 45\%$) n'ont pas une répartition des catégories fonctionnelles significativement différente de celle du génome. Ce qui supposerait, pour un nombre réduit de gènes respectivement 40 et 254, une réponse directement corrélée à toutes les potentialités du génome, conjoncture peu vraisemblable dans le cas de notre étude. Il existe donc pour les 292 gènes concernés, une forte probabilité qu'il s'agisse d'un artefact lié à la mesure même de la réponse transcriptomique. Seule une analyse plus poussée permettra de conclure.

III.2.3.b. Analyse des catégories fonctionnelles par classe

Afin de caractériser les classes par leurs fonctionnalités, notre objectif est de savoir si une fonction est largement surreprésentée ou sous représentée, sachant qu'une fréquence élevée pour un groupe de fonctions peut être liée à une sous représentation d'un autre groupe et inversement. Pour cela, nous avons recalculé d'une part un profil théorique $Y_i^{sur exp}$ par classe en ramenant la fréquence des fonctions apparaissant comme surexprimées à la fréquence calculée pour le génome entier, et d'autre part un profil théorique $Y_i^{sous exp}$, par un calcul équivalent pour les fonctions présentant une sous expression. Un critère de représentativité est calculé fonction par fonction et classe par classe à partir de ces profils théoriques et du profil génomique à partir du calcul du χ^2 :

$$\chi^2 = N^{sur exp} \cdot \frac{(Y_i^{sur exp} - Y_i^{génomique})^2}{Y_i^{génomique}} + N^{sous exp} \cdot \frac{(Y_i^{sous exp} - Y_i^{génomique})^2}{Y_i^{génomique}} .$$

Les résultats sont exprimés comme la probabilité d'une représentativité atypique par rapport à celle du génome P^{repr} , valeurs reportées dans le tableau 31, positives pour une surreprésentation et négatives pour une sous représentation. Ne sont reportés ici que les résultats significatifs, c'est à dire supérieurs à la réponse de plus ou moins une unité par catégorie fonctionnelle, soit supérieurs à 30% (facteur de 1,5 à 2 fois la fréquence théorique génomique).

Ce type de calcul permet l'analyse intra classe mais également interclasse pour une fonction donnée indépendamment du nombre de gènes par classe.

Tableau 31 : Valeurs du critère P^{repr} pour les catégories fonctionnelle significativement sur et sous représentées pour chacune des classes cinétiques (acide propionique).

Catégorie fonctionnelle	Classe						Totalité des gènes
	1	2	3	4	5	6	
Energie	x	x	50%	x	44%	x	38%
Synthèse de protéines	40%	x	x	x	x	x	x
Biogenèse de composants cellulaires	32%	x	x	x	x	x	x
Devenir des protéines	x	x	x	x	x	x	-36%
Transport cellulaire	x	x	x	36%	x	x	x
Transcription	x	x	x	x	x	x	-36%
Métabolisme	x	x	48%	x	38%	x	32%
Fonction inconnue	68%	31%	x	x	86%	83%	77%

Globalement seules 8 catégories fonctionnelles sont retenues par ce test avec un seuil de probabilité d'acceptation de 30 % et sur la globalité des gènes impliqués dans la réponse cellulaire seule la surreprésentation des « fonctions inconnues » est distinctement observable. A partir de l'analyse par classe, pour lesquelles n'apparaît que le critère de surreprésentation, on retiendra par ordre décroissant les fonctions inconnues (classes n°1, 2, 5 et 6), « l'énergie » (classes n°3 et 5), le « métabolisme » (classes n°3 et 5), la synthèse protéique (classe n°1) et le transport cellulaire (classe n°4). La faible sélectivité pour une seule classe fonctionnelle dans les classes 2 et 4, confirme le résultat du test du χ^2 appliqué sur l'intégralité de la classe.

Concernant les sous-catégories fonctionnelles, et tout particulièrement l'énergétique, ce sont le TCA (classe n°2) et la conservation de l'énergie (classes n°3, 5, 6) qui sont majoritairement représentées. Il est intéressant de noter que dans la classe n°3, 10 gènes codent pour des protéines appartenant à la sous-catégorie fonctionnelle « transport mitochondrial », ces gènes sont sous exprimés 5 min après le choc acide, puis surexprimés 30 min après et enfin, leur expression est identique à la référence. Parmi ces gènes notons, des transporteurs ADP/ATP (*AAC1* et *AAC3*), des gènes du complexe F1F0-ATPase (*ATP1*, *ATP2* et *ATP4*), un transporteur du phosphate (*MIR1*) et un transporteur des dicarboxylates (*DIC1*).

III.2.3.c. Analyse de la localisation par classe

A l'aide de la base de données MIPS où les gènes sont repartis dans 21 localisations différentes, nous avons observé la répartition des différentes localisations dans chaque classe (Tableau 32).

Tableau 32 : Fréquence d'apparition d'une localisation pour chaque classe et dans le génome complet.

Localisation	Classe						génom
	1	2	3	4	5	6	
cytoplasme	25	12	64	69	25	37	2906
membrane non spécifique	3	1	3	6	4	8	176
membrane plasmique	2	0	5	13	4	6	186
paroi cellulaire	0	0	2	3	3	0	42
vésicules	2	0	2	2	1	6	139
réticulum endoplasmique	7	2	16	23	8	9	557
peroxysome	0	0	1	5	1	1	52
vacuole	5	1	4	6	7	6	281
mitochondrie	24	10	31	31	16	16	1056
extracellulaire	1	0	2	4	4	0	54
bourgeon	5	0	0	4	0	4	149
périphérie cellulaire	4	1	2	4	5	3	216
cytosquelette	7	1	4	3	2	2	204
golgi	2	0	3	6	1	4	158
inconnue	24	10	26	64	19	66	1515
ambiguë	7	0	0	6	1	4	237
composés putatifs	4	1	4	5	3	4	141
particules lipidiques	0	0	1	0	0	0	27
microsome	0	0	0	0	0	0	5
endosome	0	0	0	1	0	0	58
noyau	22	6	42	51	15	40	2158

Le test du khi deux en première approche nous indique qu'aucune des répartitions dans les classes n'est identique à la répartition du génome (Tableau 28). Les classes n°2 et 5 montrent des fréquences de répartition de localisation très différentes de celles du génome.

De la même manière que précédemment, nous avons calculé une représentativité des localisations pour chaque classe et pour les gènes impliqués dans la cinétique de réponse (Tableau 33). Seules sont présentées ici les localisations où la valeur du critère P^{repr} est significative (supérieure à 30 %).

Tableau 33 : Valeurs du critère P^{repr} pour les localisations cellulaires significativement sur et sous représentées pour chacune des classes cinétiques (acide propionique).

Localisation	Classe						Totalité des gènes impliqués
	1	2	3	4	5	6	
cytoplasme	-59%	-31%	39%	-50%	-41%	-70%	-81%
membrane plasmique	x	x	x	40%	x	x	x
paroi cellulaire	x	x	x	x	35%	x	x
mitochondrie	48%	60%	42%	x	x	x	39%
extracellulaire	x	x	x	x	47%	x	x
cytosquelette	31%	x	x	x	x	x	x
inconnue	33%	33%	x	62%	33%	98%	82%
noyau	-36%	x	x	-39%	-43%	-49%	-69%

Sans surprise, la localisation « inconnue » corrobore la surreprésentation des fonctions « inconnues » globalement et selon les classes. Notons la sous représentation des fonctionnalités cytoplasmiques et nucléaires et une surreprésentation des fonctionnalités mitochondriales pour les classes n°1, 2 et 3. Le recoupement des catégories fonctionnelles et des localisations cellulaires permet de proposer un profil qualitatif pour les classes de 1 à 5 qui paraissent en accord avec les conclusions sur les principaux mécanismes pressentis à partir de l'analyse cinétique macroscopique et cellulaire (Tableau 34).

Tableau 34 : Recoupement des localisations et catégories fonctionnelles soulignées par le test du khi deux pour chaque classe.

Classe	Localisation	Fonctionnalités
1	mitochondrie, cytosquelette	synthèse protéique, composants cellulaires
2	mitochondrie	
3	cytoplasme, mitochondrie	Energie, métabolisme
4	membrane plasmique	transport cellulaire
5	paroi cellulaire, extracellulaire	Energie, métabolisme

III.2.3.d. Comparaison avec les données macroscopiques

Un de nos objectifs était de corrélérer les données macroscopiques aux données génomiques. Les 6 classes obtenues par le traitement réalisé sous Matlab ont été comparées à plusieurs variables macroscopiques qui interviennent dans la réponse à l'acide : la vitesse spécifique de consommation d'oxygène, le potassium, le magnésium, le tréhalose, le glycogène et les différents métabolites intracellulaires. Les valeurs des variables macroscopiques utilisées sont une moyenne brutes des valeurs obtenues sur chaque phase de la respiration (a, b, c, d). C'est donc le profil des différentes valeurs

macroscopiques que nous comparons au profil de variation des gènes de chaque classe. Pour ce traitement nous établirons le coefficient de corrélation de Pearson (cf. § II) qui est proche de 1 si les variables sont directement corrélées et de -1 si elles sont inversement corrélées. Un coefficient supérieur à la valeur absolue de 0,75 sera jugé comme significatif d'une corrélation entre les données (Tableau 35).

Tableau 35 : Matrice de corrélation entre les variables macroscopiques et les différentes classes, obtenue par traitement des données sous une application Matlab.

Variables	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5	Classe 6
q _{O2}	0,12	0,09	0,02	-0,11	-0,27	-0,01
potassium	0,82	0,61	-0,11	-0,50	-0,93	0,09
magnésium	0,47	0,93	0,04	-0,21	-0,77	-0,05
tréhalose	-0,47	-0,82	-0,01	0,22	0,60	0,02
glycogène	-0,33	-0,46	0,04	0,17	0,28	-0,02
T-6-P	0,01	-0,13	-0,24	-0,05	0,15	0,23
G-6-P	-0,6	-0,82	0,02	0,3	0,78	-0,01
F-6-P	-0,19	-0,15	0	0,17	0,38	0
F-1,6-P ₂	0,48	-0,03	-0,92	-0,75	-0,17	0,89
PEP	-0,12	-0,21	-0,1	0,07	0,33	0,09
acide pyruvique	-0,01	0,48	0,6	0,15	-0,17	-0,61
acide fumarique	0,12	0,53	0,25	-0,02	-0,42	-0,26
acide citrique	0,06	0,48	0,36	0,04	-0,3	-0,37
acide malique	0	0,42	0,49	0,11	-0,21	-0,5

La première des observations est qu'il n'existe aucune corrélation entre une classe de gènes et la vitesse spécifique de consommation d'oxygène, ni le pools des intermédiaires du cycle de Krebs. Ainsi, pour ces variables non corrélées, il semblerait que leur dynamique puisse résulter de mécanismes multiples, qui sur le plan transcriptomique se répartissent sur l'ensemble des classes cinétiques décrites.

De même, en dépit de l'induction de la dégradation des sucres de réserves, puis de leur reconstruction, observées macroscopiquement, aucun gène impliqué dans leur synthèse ou leur consommation ne voit son expression varier suite au pulse d'acide. En particulier, aucun gène relatif au métabolisme du tréhalose n'appartient à la classe n°2 cinétiquement négativement corrélée à ce sucre signifiant un contrôle métabolique plutôt que génétique.

Deux métabolites intracellulaires montrent des corrélations avec des classes : le G-6-P montre une corrélation positive avec la classe n°5 et négative avec la classe n°2, le F-1,6-P₂ montre une corrélation positive avec la classe n°6 et des corrélations négatives avec les classes n°3 et 4.

En ce qui concerne les teneurs en métabolites de la glycolyse, seuls le G-6-P et le F-1,6-P₂ paraissent significatifs d'une corrélation, mais le seul lien caractéristique

pouvant être établi avec le profil qualitatif des classes est la corrélation négative entre le F-1,6-P₂ et la classe n°3 caractérisée (métabolisme, énergie, cytoplasme).

Il existe une corrélation positive entre le potassium et la classe n°1, entre le magnésium et la classe n°2 et une corrélation négative entre le potassium et la classe n°5, entre le magnésium et la classe n°5. La corrélation positive entre le magnésium et la classe n°2 qui principalement regroupe l'énergétique cellulaire conforte notre idée de l'implication du magnésium au niveau des ATPases.

Les seuls résultats présentant une certaine cohérence semble être le potassium anti-corrélé avec la classe n°5 et satisfaisant à l'observation macroscopique d'une diminution de l'activité énergétique avec l'import de ce cation, alors que pour le magnésium, de part son implication dans les activités énergétiques, une corrélation positive était attendue avec les classes caractérisées par cette fonctionnalité.

III.2.4. Conclusions

Notre tentative de réconciliation des informations cinétiques amène à plusieurs constatations sur les objectifs, la démarche, les limites de l'outil mathématique et les perspectives d'une telle approche.

Positivement, la classification semble conduire à un regroupement des gènes selon des classes pour lesquelles il est possible d'associer certaines catégories fonctionnelles caractéristiques, même si la plus significativement représentée est celle des fonctionnalités indéterminées. Il semblerait ainsi que l'on puisse focaliser l'étude sur un nombre de gènes d'intérêt plus restreint que celui fourni par les données brutes. Cette procédure de réduction de l'information exige un traitement statistique itératif, tant que la détermination des classes sera basée sur une classification globale hiérarchisée. En effet pour certaines classes appréciées non significatives dans leur globalité, avec l'analyse statistique des fonctionnalités du génome, il s'avère que certains items se confirment être significativement sur ou sous représentatifs de cette classe. Selon notre interprétation, 3 catégories fonctionnelles regroupant l'« Energie », le « métabolisme » et à un degré moindre le « transport cellulaire » seraient appropriées à une interprétation génomique des mécanismes induits par l'acide propionique. La localisation cellulaire des fonctions serait principalement focalisée sur la mitochondrie, la membrane plasmique et les échanges extracellulaires, en adéquation avec nos conclusions de l'interprétation cinétique des variables macroscopiques et cellulaires. Les conclusions partielles sur la discrimination des principales fonctionnalités physiologiques et localisations cellulaires devraient être confirmées par des mesures directes des activités catalytiques et/ou des régulations ainsi suspectées.

La non corrélation entre l'évolution cinétique de certaines variables (vitesse de respiration, sucres de réserves, pools d'intermédiaires glycolytiques et du cycle des

acides tricarboxyliques) et l'évolution d'expression des gènes de classes apparemment bien caractérisées par les fonctionnalités « Energie » et « Métabolisme » montrent les limites de l'interprétation statistique proposée.

L'impossibilité d'associer de manière fiable une dynamique de variables macroscopiques ou cellulaires à une classe cinétique de gènes ne nous permet pas d'identifier l'une d'elles comme marqueur d'une variabilité d'une expression génomique et, aucun élément ne nous permet de rechercher dans l'expression génomique une interprétation directe du comportement physiologique observé.

Notre choix d'une méthode statistique requérant un effectif relativement important pour être appliquée a conduit à un nombre de classes trop faible pour pouvoir discriminer chacune d'elle selon des catégories fonctionnelles spécifiques. Il devient obligatoire de faire appel à des méthodes aptes à traiter des groupements à faible nombre de spécimens.

Bien que pour l'expérimentation suivante le nombre de gènes significativement exploitables soit nettement inférieur, cette démarche d'une interprétation statistique sera reprise, avec ses limites, pour une tentative d'identification d'un profil de classe similaire afin de cerner les fonctionnalités soumises à un contrôle génomique pouvant être corrélée à la réponse à un acide faible.

IV. Analyse de la réponse à l'acide sorbique

Une cinétique des transcrits identique à celle précédemment réalisée a été effectuée suite à un pulse d'acide sorbique dans le réacteur (culture décrite dans le chapitre IV, Résultats). Les prélèvements (5 min, 60 min et 205 min après le pulse) correspondent à des phases de respiration caractérisées : accélération de la respiration, phase d'oscillations et retour à un métabolisme balancé. Comme précédemment décrit, seuls les gènes subissant une variation d'expression (supérieur à 1,5 ou inférieur à 0,6) au moins une fois dans un de ces prélèvements sont pris en compte, ce qui correspond à une population de 215 gènes. Les catégories fonctionnelles impliquées dans cette cinétique sont principalement celles impliquées dans la cinétique relative à propionique (métabolisme : 19 %, énergie : 9 %, transport cellulaire : 7 %, Figure 70).

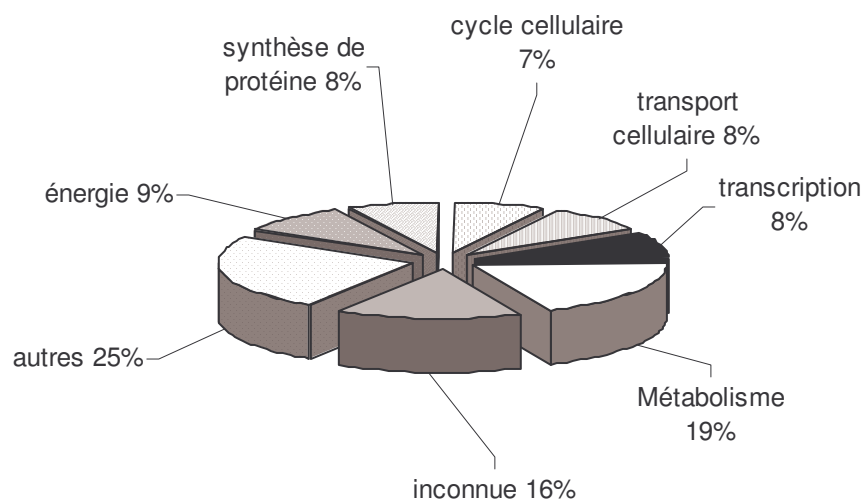


Figure 70 : Répartition fonctionnelle des gènes subissant une variation d'expression lors de l'analyse cinétique suite au pulse d'acide sorbique pour la culture à pH 5 et μ de 0,1 h⁻¹.

IV.1. Répartition en classes cinétiques

La catégorisation en fonction des profils d'expression a été réalisée selon l'application Matlab. Afin de satisfaire une analyse significative en terme de nombres de gènes par chaque classe, le nombre de classes a été limité à 4 selon les critères ci-dessus exposés (Figure 71). Visuellement, nous constatons que la catégorisation est principalement basée sur une variation continue ascendante (classe n°1) ou descendante (classe n°4) et une allure présentant une concavité haute (classe n°2) ou basse (classe n°3), indépendamment de l'homogénéité d'amplitude intrinsèque de chacune des classes.

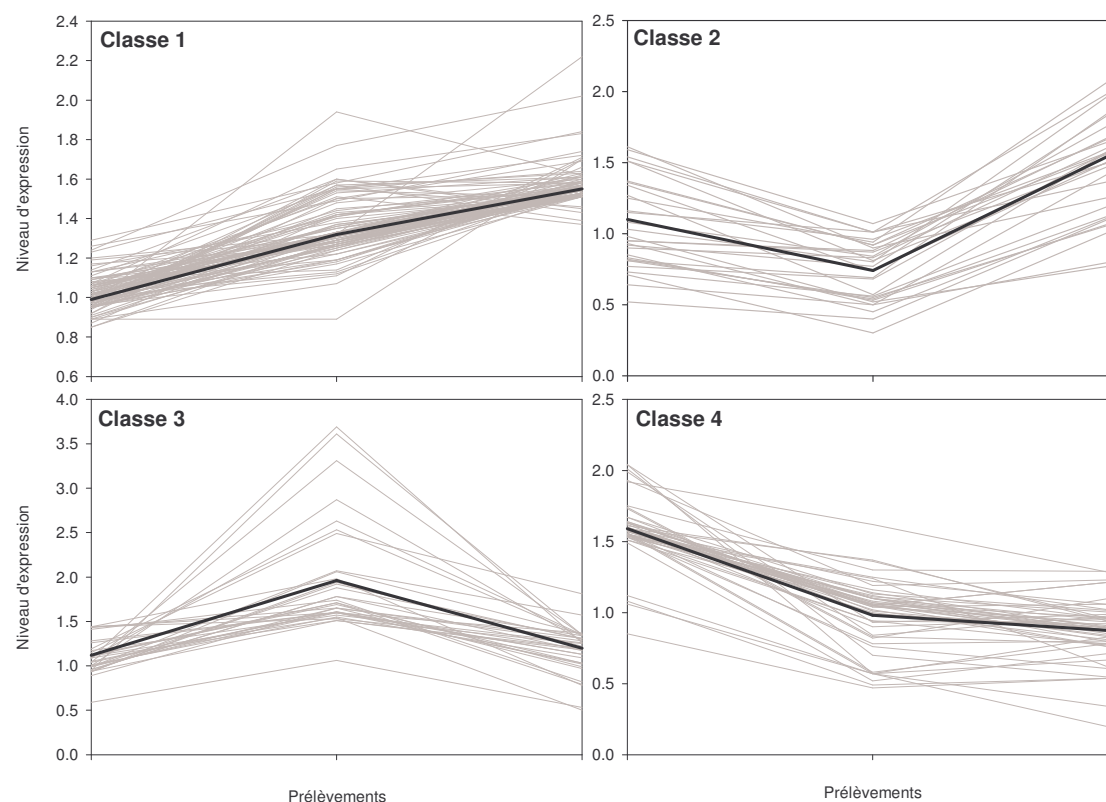


Figure 71 : Profils d'expression dans les différentes classes après traitement sous l'application Matlab. Le profil d'expression en noir représente la moyenne des profils d'expression pour chaque classe.

Tableau 36 : Répartition des gènes, de catégories fonctionnelles, localisations et du seuil de confiance de similitude respectif χ^2_{seuil} pour les différentes classes (acide sorbique).

Classe	1	2	3	4	TOTAL
Nombres de gènes	95	32	36	51	214
Nombres de catégories fonctionnelles	129	44	51	70	294
χ^2_{seuil} / Fonctions	0,5%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%
Nombres de localisation	138	52	54	78	322
χ^2_{seuil} / Localisations	24,6%	0,0%	15,4%	3,3%	0,2%

Les quatre classes définies semblent significatives d'une représentativité fonctionnelle atypique alors que seules les classes n°2, 3 et 4 le seraient en ce qui concerne les localisations cellulaires (Tableau 36).

Les tableaux 37, 38, 39 et 40 reportent les fréquences brutes de présence de 294 catégories fonctionnelles et 322 localisations cellulaires associées aux 214 gènes retenus.

Tableau 37 : Représentativité de chaque catégorie fonctionnelle pour chaque classe et pour le génome complet.

Catégorie fonctionnelle	Classe				génom
	1	2	3	4	
Eléments transposables	0	0	0	0	32
Régulation de l'activité protéique	0	0	0	0	240
Protéines nécessitant des cofacteurs	1	0	0	0	1038
Communication cellulaire	0	0	0	0	225
Energie	9	9	6	3	366
Défenses cellulaires	4	2	1	6	553
Interaction avec l'environnement cellulaire	4	1	2	2	460
Différenciation cellulaire	6	0	3	2	430
Synthèse de protéines	4	0	0	19	472
Biogenèse de composants cellulaires	10	2	2	4	857
Devenir des protéines	6	1	1	3	1089
Cycle cellulaire	15	0	4	3	1006
Transport cellulaire	9	7	6	7	1035
Transcription	14	0	8	3	1065
Métabolisme	14	16	12	13	1506
Fonction inconnue	33	6	6	5	2239

Tableau 38 : Valeurs du critère P^{repr} pour les catégories fonctionnelles significativement sur et sous représentées pour chacune des classes cinétiques (acide sorbique).

Catégorie fonctionnelle	Classe				Total
	1	2	3	4	
Protéines nécessitant des cofacteurs	x	x	x	x	-32%
Energie	40%	93%	62%	x	79%
Synthèse de protéines	x	x	x	100%	66%
Devenir des protéines	x	x	x	x	-39%
Transport cellulaire	x	53%	x	36%	41%
Transcription	x	x	33%	x	x
Métabolisme	x	86%	54%	41%	64%
Fonction inconnue	52%	-51%	x	-42%	-34%

Tableau 39 : Fréquence d'apparition d'une localisation pour chaque classe et dans le génome complet.

Localisation	Classe				génomé
	1	2	3	4	
cytoplasme	43	14	13	36	2906
membrane non spécifique	1	2	1	3	176
membrane plasmique	1	1	1	3	186
paroi cellulaire	1	1	1	0	42
vésicules	1	0	0	1	139
réticulum endoplasmique	8	5	3	1	557
peroxysome	0	3	0	0	52
vacuole	1	2	2	4	281
mitochondrie	19	15	7	4	1056
extracellulaire	0	1	1	0	54
bourgeon	2	0	1	1	149
périphérie cellulaire	2	1	4	2	216
cytosquelette	3	0	0	0	204
golgi	1	0	0	0	158
inconnue	10	1	3	6	1515
ambiguë	3	0	2	2	237
composés putatifs	3	0	1	1	141
particules lipidiques	1	1	0	0	27
microsome	0	0	0	0	5
endosome	1	0	0	0	58
noyau	37	5	14	14	2158

Tableau 40 : Valeurs du critère P^{repr} pour les localisations cellulaires significativement sur et sous représentées pour chacune des classes cinétiques (acide sorbique).

Localisation	Classe				génomé
	1	2	3	4	
cytoplasme	44%	-78%	x	84%	78%
peroxysome	x	63%	x	x	x
mitochondrie	x	82%	x	x	43%
périphérie cellulaire	x	x	43%	x	x
inconnue	-43%	-31%	x	-30%	-64%
noyau	41%	-37%	x	-34%	36%

Sur l'ensemble des constatations, nous remarquons que les fonctions énergétiques, métaboliques et transports cellulaires se retrouvent également surreprésentés. La fonction « synthèse protéique » surreprésentée dans classe n°4 l'est également pour l'acide propionique (classe n°1). Néanmoins, pour l'acide propionique,

nous avons en plus des catégories précédemment citées, la fonction « synthèse protéique » retrouvée dans les classes n°4 et n°1. Les « fonctions inconnues » majoritairement surreprésentées pour l'acide propionique apparaissent ici sous-représentées.

Les localisations cellulaires qui sont surreprésentées sont le cytoplasme et la mitochondrie avec le peroxyosome dont on peut supposer que cette dernière localisation correspond à des activités liées au métabolisme lipidique. Le profil qualitatif des classes est résumé dans le tableau 41.

Tableau 41 : Recoupement des localisations et catégories fonctionnelles soulignées par le test du khi deux pour chaque classe.

Classe	Localisation	Fonctionnalités
1	Cytoplasme	Energie
2	Peroxyosome, mitochondrie	Energie, transport cellulaire, métabolisme
3	Périphérie cellulaire	Energie, métabolisme
4	Cytoplasme	Synthèse protéine, transport cellulaire, métabolisme

Sur ces critères qualitatifs, aucune correspondance directe ne peut être validée entre les classes cinétiques obtenues avec l'acide propionique et celles définies pour l'acide sorbique. Notre approche statistique n'est pas assez discriminatoire par manque d'informations transcriptomiques temporelles en comparaison de l'information cinétique sur les variables macroscopiques, mais également par manque d'outils mathématiques pour traiter l'information acquise. Toutefois, il apparaît que tant pour les fonctions physiologiques (l'énergie, le transport et le métabolisme) que pour les localisations cellulaires (la mitochondrie en particulier), la redondance entre les deux acides est de nature à conforter nos conclusions premières, à savoir, que ce sont les mécanismes généraux de l'homéostasie cellulaire qui sont impliqués dans la réponse aux acides faibles et non une seule fonctionnalité nouvelle induite.

V. Analyse des gènes communs entre les acides sorbique et propionique

Par cette étude différentielle avec les acides propionique et sorbique, nous voulions identifier les éléments spécifiques lors de la réponse au stress entre deux acides et ainsi discriminer les effets spécifiques à chacun des acides. Seuls 51 gènes sont communs aux deux cinétiques dont 46 qui se répartissent dans les catégories fonctionnelles « métabolisme » (14), de l'« énergie » (12), du « transport cellulaire »

(10) et de « fonction inconnue » (12) (Tableau 42). Ces protéines sont principalement localisées dans le cytoplasme (24) et dans la mitochondrie (21). Pour ces 51 gènes, 10 subissent des variations cinétiques d'expression qualitativement identiques (*ALD4*, *DDR2*, *PDR12*, *PHB2*, *RPS31*, *YGR093w*, *YIL057c*, *YLR327c*, *YMR107w*, *YPL275w*).

Tableau 42 : Gènes communs aux cinétiques de stress à l'acide propionique et sorbique, L'expression dans les trois prélèvements (5, 60 et 205 minutes après le pulse d'acide) est représentée par 0 pour aucune variation, - pour une sous expression et + pour une surexpression, Les gènes apparaissant grisés subissent des variations identiques.

Gène	Fonction biologique	Acide propionique	Acide sorbique
<i>AAC3</i>	transporteur mitochondrial de l'ADP/ATP	- 0 -	0 + 0
<i>ACO1</i>	aconitate hydratase	0 + 0	0 + +
<i>ACS1</i>	acétyl-CoA synthase	- - 0	0 - 0
<i>ADH1</i>	alcool déshydrogénase I	0 0 -	0 + 0
<i>ADY2</i>	protéine essentielle pour l'activité des perméases de l'acétate	0 - 0	- - 0
<i>ADY4</i>	protéine de structure	- + -	0 0 +
<i>ALD4</i>	aldéhyde déshydrogénase, mitochondriale	0 - +	0 - +
<i>ATP2</i>	F1F0-ATPase complexe, F1 sous unité beta	- 0 -	0 + 0
<i>CIT2</i>	citrate (si)-synthase, peroxysomale	0 + 0	+ 0 +
<i>CIT3</i>	citrate (si)-synthase, mitochondriale	- 0 0	0 0 +
<i>CRC1</i>	transporteur mitochondrial de carnitine	0 + 0	0 0 +
<i>CYC1</i>	cytochrome-c isoforme 1	0 + 0	0 + +
<i>DDR2</i>	protéine de stress thermique	0 - 0	0 - 0
<i>DIC1</i>	Transporteur mitochondrial de dicarboxylate	- 0 -	0 0 +
<i>DLD3</i>	D-lactate déshydrogénase	0 + 0	+ 0 +
<i>FUN34</i>	protéine impliquée dans la production d'ammonium	- 0 -	0 0 +
<i>GDH2</i>	NAD-spécifique glutamate déshydrogénase	- 0 0	0 0 +
<i>HKR1</i>	protéine de la membrane plasmique impliquée dans la résistance à des toxines	0 0 -	0 + 0
<i>HSP12</i>	protéine de stress thermique	- - 0	+ 0 0
<i>HTA1</i>	histone H2A	0 0 -	0 + 0
<i>HXT5</i>	protéine de la famille des Hxt avec une activité intrinsèque de transport d'hexose	- 0 0	0 - 0
<i>MAL32</i>	alpha-glucosidase	0 + 0	0 + -
<i>MET17</i>	O-acétylhomoserine sulfhydrylase	+ 0 0	0 + 0
<i>MET3</i>	sulfate adénylyltransférase	+ 0 +	0 + 0
<i>MIR1</i>	transporteur mitochondrial de phosphate	- + -	0 + 0
<i>NKP1</i>	protéine non essentielle du kinétochore	- 0 -	0 0 +
<i>OLE1</i>	stéaroyl-CoA désaturase	- 0 -	0 + +
<i>OLI1</i>	F1F0-ATPase complexe, F0 sous unité 9	0 + 0	+ 0 0
<i>PDH1</i>	protéine mitochondriale qui participe à la respiration	0 + 0	0 0 +
<i>PDR12</i>	transporteur de la membrane plasmique	+ + +	+ + +
<i>PHB2</i>	prohibitine	+ 0 0	+ 0 0
<i>PIB2</i>	protéine liée au phosphatidylinositol 3-phosphate	- - -	- 0 0
<i>RPS31</i>	ubiquitine-protéine ribosomale petite sous unité 40S	+ + 0	+ 0 0
<i>SBP1</i>	protéine liée à l'ADN simple brin	0 0 +	- 0 -

Gène	Fonction biologique	Acide propionique	Acide sorbique
<i>SOL3</i>	possible 6-phosphogluconolactonase	0 - 0	- - 0
<i>SWE1</i>	protéine kinase ser/tyr double spécificité	0 - +	+ 0 0
<i>TPO2</i>	transporteur supposé de la polyamine, vacuolaire	0 - 0	+ - 0
<i>UFD4</i>	ubiquitine-protéine ligase (E3)	+ + +	+ 0 -
<i>YAP7</i>	protéine impliquée dans l'activation de la transcription	0 0 -	0 + 0
<i>YAT2</i>	carnitine O-acétyltransférase	- 0 0	0 0 +
<i>YDL196w</i>	protéine hypothétique	0 0 -	0 + 0
<i>YEF3</i>	facteur d'élongation eEF3	0 + 0	+ + 0
<i>YGR093w</i>	protéine de fonction inconnue localisée dans le noyau	+ 0 0	+ 0 0
<i>YGR115c</i>	protéine hypothétique	+ 0 0	+ 0 -
<i>YIL057c</i>	protéine de fonction inconnue localisée dans le cytoplasme	- - 0	- - 0
<i>YLR327c</i>	protéine prédite comme étant impliquée dans les fonctions ribosomiques cytoplasmiques	- 0 0	- 0 0
<i>YMR107w</i>	protéine requise pour la survie à haute température pendant la phase stationnaire	0 - 0	0 - 0
<i>YNR034WA</i>	protéine de fonction inconnue	0 0 +	+ 0 +
<i>YNR065c</i>	homologue de la sortiline	0 0 -	0 0 +
<i>YOR097c</i>	protéine de fonction inconnue	- 0 0	0 0 +
<i>YPL275w</i>	forte similarité à la NAD ⁽⁺⁾ -dépendante formate déshydrogénase FDH2	0 - 0	0 - 0

Concernant les transporteurs, deux gènes fortement surexprimés suite aux pulses des deux acides sont *PDR12* déjà mentionné dans l'étude précédente et *OLI1* codant pour la sous unité 9 du complexe F1F0-ATPase mitochondriale et intervenant dans de nombreuses fonctions : l'homéostasie des protons, le transport mitochondrial, le transport des cations et la génération d'énergie (Devenish et coll., 2000). Deux transporteurs de la carnitine (*YAT2*, carnitine acétyltransférase et *CRC1*, transporteur mitochondrial de la carnitine) sont des gènes communs à ces deux cinétiques. Toutefois, alors que l'expression de ces gènes est réprimée en présence d'acide propionique, pour l'acide sorbique, elle est augmentée. Par ailleurs, pour la cinétique avec l'acide sorbique, le niveau d'expression du gène *YAT1* est lui aussi plus élevé (ratio de 2 par rapport à la référence), il code pour une carnitine acétyltransférase uniquement mitochondriale alors que Yat2p est à la fois cytoplasmique et mitochondriale.

V.1. Spécificité de l'acide sorbique

De nombreux autres gènes sont spécifiques du stress à l'acide sorbique. Nous avons noté la surexpression d'un transporteur du zinc (*ZRT1*) déjà observée par Schüller et coll. (2004) et de nombreux gènes qui interviennent dans le métabolisme des acides gras : *FAS2*, *FAA4*, *CAT2*, *SUR4*, *ERG27*, *OPI3*, *ERG25*, *ACB1*, *ARG82*, *OLE1*. Les niveaux d'expression de ces gènes augmentent au fur et à mesure de la cinétique. L'expression

de ces gènes du métabolisme des acides gras sont à mettre en relation avec la surexpression des gènes codant pour les carnitine acétyltransférases qui sont connues pour être présentes dans le levure lors de la dégradation des acides gras et notamment l'acide oléique (Atomi et coll., 1993). La surreprésentation génique correspondant à la localisation cellulaire « peroxyosome » pourrait trouver son origine dans une telle amplification du métabolisme lipidique.

Concernant les protéines de stress thermique (HSP, Heat Shock Proteins), quatre interviennent dans la réponse à l'acide sorbique dont 2 instantanément au stress (Hsp12p et Hsp26p) et reviennent à un niveau d'expression basal 60 minutes après le pulse. Deux protéines voient leur niveau d'expression augmenter progressivement pour atteindre un maximum sur le dernier prélèvement (Hsp60p et Hsp104p). Ces deux dernières sont des ATPases (respectivement mitochondriale et cytoplasmique) alors que Hsp12p et Hsp26p sont des protéines chaperonnes et sont toutes deux induites par un stress osmotique (Varela et coll., 1996). La surexpression du gène *HSP26* a déjà été observée dans la littérature suite à une croissance à faible pH (Carmelo et Sa-Correia, 1997) ou à un stress à l'acide sorbique (Nobel et coll., 2001) et est décrite comme une protéine conférant la résistance aux effets inhibiteurs de l'acide. D'après nos résultats, cette protéine n'interviendrait que dans la réponse spécifique à l'acide sorbique avec surexpression uniquement transitoire.

V.2. Comparaison avec d'autres analyses transcriptomiques de la littérature

Nous avons voulu confronter nos données transcriptomiques à celles de la littérature même si, dans celle-ci, l'analyse transcriptomique de la réponse à un pulse acide a été réalisée principalement avec l'acide sorbique (Schüller et coll., 2004 ; de Nobel et coll., 2001). L'objectif était, à partir du constat de similitude de la réponse macroscopique de trouver une réponse transcriptomique commune aux deux acides et de ce fait, spécifique de l'effet acide en général. Or, il s'avère que très peu de gènes sont communs entre ceux relevés dans la littérature et nos propres résultats. Nous avons montré que le profil de transcription était fortement dépendant des conditions de culture et que malgré notre maîtrise des facteurs environnementaux physico-chimiques et nutritionnels, une variabilité importante advenait. La majorité, sinon la totalité des expérimentations reportées dans la littérature ont été réalisées en fioles d'Erlenmeyer, ce qui présume d'un métabolisme énergétique oxydo-réductif et d'un environnement non maîtrisé. Nos résultats ont démontré la prépondérance de l'aspect énergétique dans la réponse homéostatique globale. Toute comparaison avec des résultats obtenus pour différents états énergétiques risque d'orienter vers des fonctionnalités qui, même si elles

apparaissent communes aux diverses conditions, oblitérent totalement les mécanismes caractéristiques de ces états physiologiques. Néanmoins, les principaux gènes communs participant à ces réponses : *PDR12* (Piper et coll., 1998), *AZR1* (Tenreiro et coll., 2000), *YSR1* (Cui et coll., 1996), *HSP26* uniquement pour l'acide sorbique (de Nobel et coll., 2001).

Concernant tout particulièrement la protéine Pdr12p, la littérature la décrit comme une « pompe » de la membrane plasmique qui catalyserait activement un efflux de la forme anionique permettant ainsi à *S. cerevisiae* de maintenir des niveaux intracellulaires d'acide faible plus bas que les niveaux attendus sur la base d'un équilibre de part et d'autre de la membrane plasmique (Piper et coll., 2003). D'après nos résultats, sur la base de l'évolution du pH estimée suite à l'ajout d'acide (proche du pH physiologique couramment admis), il ne semble pas qu'un tel mécanisme intervienne et bien que l'homéostasie soit rétablie par un import de potassium avec une cinétique dépendante de la disponibilité d'une énergie oxydative (cf. chapitre V, Résultats). Par ailleurs, que ce soit pour l'acide sorbique ou pour l'acide propionique en métabolisme oxydo-réductif, nous observons l'entrée progressive des acides dans la cellule, avec une neutralisation concomitante de potassium sans aucune sortie de l'acide. Ainsi, nous pourrions supposer que Pdr12p participerait à l'effet premier de l'acide dans la régulation du pH_i avec une accélération de l'import de potassium dans la cellule.

VI. Conclusions Discussion

L'analyse transcriptomique réalisée dans cette étude avait pour objectif principal de définir des méthodologies d'analyse de cinétiques d'expression de transcrits durant la réponse cellulaire suite à une exposition à des acides faibles. La démarche consistait à définir des « clusters » cinétiques selon une classification hiérarchique et de les qualifier par des fonctionnalités ou des localisations cellulaires sur ou sous représentées. Par la suite, une recherche d'éventuelles corrélations entre les évolutions dynamiques macroscopiques et cellulaires et les classes cinétiques a été tentée. Il s'agissait de conforter certaines hypothèses mécanistiques avancées sur la prédominance d'un mécanisme de régulation du pH_i par l'énergétique et par l'import de cations, de régulation de la pression osmotique et de la compartimentation du potassium. L'analyse différentielle entre les réponses fonctionnelles aux acides propionique et sorbique devait faire ressortir les spécificités de la fonction acide et celles de chacun des acides.

Une attente était de dégager des fonctionnalités relatives à un état physiologique caractérisé par une forte capacité fermentaire en présence d'acides faibles. En effet il nous semblait peu probable qu'un seul gène codant pour une activité protectrice globale

puisse être activé et que, simultanément, une réponse impliquant environ deux cents gènes puisse se poursuivre sur une large période en absence de l'effecteur.

VI.1. Limites des traitements des données

Les objectifs nous ont amenés à mettre en œuvre des approches mathématiques (classification, test d'hypothèse, corrélations) non disponibles et non regroupées sur les logiciels d'analyse classiques et donc à développer des applications logicielles spécifiques. Il est apparu que notre choix d'analyse statistique (khi deux) de discrimination de la sur ou sous représentation fonctionnelle dans un groupement de gènes imposait un nombre de gènes relativement élevé par classe et donc un nombre réduit de classes. La caractérisation fonctionnelle de ces classes ainsi obtenue s'est révélée insuffisante pour définir chacune d'elles selon des caractéristiques descriptives spécifiques. Ainsi, il s'est avéré impossible de corréliser correctement les variables macroscopiques et cellulaires aux catégories fonctionnelles significativement identifiées. Les seules conclusions probantes de cette approche sont que les activités physiologiques impliquant l'énergétique cellulaire, les transports cellulaires et le métabolisme avec une localisation cellulaire principale, la mitochondrie, sont les éléments redondants pour l'analyse différenciée sur les acides sorbique et propionique.

Toutefois, l'identification de fonctionnalités évaluées comme pouvant être une expression statistique de l'ensemble du génome pourrait permettre d'éliminer de l'analyse globale, à *posteriori*, les gènes ainsi sélectionnés et de réduire le champ d'investigation.

Même si ces résultats corroborent nos hypothèses mécanistiques impliquées dans l'homéostasie cellulaire telles que précédemment décrites, ils semblent insuffisants pour valider notre démarche analytique.

Dans une démarche prospective, ces conclusions devraient être validées par des études physiologiques beaucoup plus ciblées notamment sur l'activité mitochondriale et probablement sur la recherche au niveau de la mitochondrie des mécanismes identifiés au niveau cellulaire.

VI.2. Bilan de l'analyse transcriptomique

Lors de cette analyse, il est ressorti que de la majorité des protéines intervenant dans la réponse à un stress acide sont de fonction ou de localisation inconnue. Parmi ces protéines nous pouvons supposer que figurent de nombreux facteurs de régulation non identifiés à ce jour, ce qui laisse une large place à des hypothèses quant aux mécanismes de régulation de l'homéostasie cellulaire.

Nous avons aussi noté lors de la cinétique de réponse à l'acide propionique la participation de plusieurs gènes intervenant dans la sous-catégorie fonctionnelle « transport des cations » au niveau de la vacuole et de la membrane plasmique. Concernant cette dernière, le gène *TRK1* est aussi surexprimé au cours de notre cinétique. Or, la participation de la protéine Trk1p en réponse à un stress acide a été récemment démontrée et des mutants de *S. cerevisiae* délétés pour ce gène deviennent sensibles aux agents conservateurs (Macpherson et coll., 2005). Ces résultats impliquant le transport des cations corroborent notre analyse macroscopique qui démontrent l'implication du potassium suite à un stress acide et sa nécessité pour la régulation du pH intracellulaire. Ces observations semblent aller dans le sens de nos constatations macroscopiques (une entrée massive de cations) et d'une hypothèse d'une internalisation ultérieure vacuolaire du potassium.

En dépit d'une forte activité liée aux sucres de réserves (dégradation puis synthèse), nous n'observons aucun changement au niveau des transcrits concernant ces voies, ce qui semble indiquer que les activités enzymatiques de synthèse et de dégradation sont constitutives. De même que pour la respiration, la cellule possède une capacité respiratoire susceptible de fournir instantanément l'énergie requise. La modification des flux de mobilisation du carbone intracellulaire, des flux cataboliques et anaboliques, ne dépend que de la flexibilité métabolique sans intervention d'une régulation génique.

Par comparaison des analyses entre l'acide sorbique et l'acide propionique, plusieurs gènes sont communs mais l'acide sorbique possède néanmoins une spécificité avec la surexpression de plusieurs gènes liés au métabolisme des acides gras. L'effet spécifique de l'acide sorbique et en particulier son implication dans la modification de conformations des membranes cellulaires (Hazan et coll., 2004) seraient à même d'expliquer la mise en place de voies de biosynthèse d'acides gras particuliers pour faire face à ces altérations.

Un état d'« adaptation », c'est à dire d'un potentiel à mieux répondre à une seconde exposition à l'acide, a été imputé à un état transitoire découlant de la dynamique des mécanismes impliqués dans les régulations du pH intracellulaire et de la pression de turgescence. Nous n'avons pas pu identifier sur l'analyse transcriptomique des réponses spécifiques de cet état. Les analyses transcriptomiques ont mis en évidence de nombreux transporteurs dont plusieurs sont décrits dans la littérature comme étant impliqués dans la réponse à un stress acide. Parmi ces gènes, notons la présence de *PDR12* et *AZR1* (Piper et coll., (1998) ; Tenreiro et coll., (2000)), qui sont décrits comme des gènes essentiels à la « résistance » aux acides faibles. Néanmoins, des mutants délétés pour le gène codant pour la protéine PDR12p reprennent leur croissance après un

temps de latence, ce qui suppose des mécanismes alternatifs, plus tardifs qui entrent en jeu dans la réponse à un stress acide (Piper et coll., 2001). Nous ne pouvons pas exclure l'implication instantanée de Pdr12p dans un mécanisme de réponse aux variations de pH intracellulaire, mais l'homéostasie cellulaire serait restaurée par ces mécanismes tardifs conformément à nos observations macroscopiques. La question que nous pouvons formuler est de savoir si Pdr12p est impliquée dans l'importation rapide des cations.

Il apparaît d'après nos observations macroscopiques et transcriptomiques que l'effet des acides faibles est instantané, que de nombreux mécanismes sont mis en place et que les répercussions de l'acide sont visibles jusqu'à 3 heures après le pulse. Ces résultats confortent notre approche cinétique de l'analyse d'un stress. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue le fait que les ARNm sont seulement un intermédiaire entre l'ADN et les protéines. Les contrôles post transcriptionnels et post traductionnels jouent aussi un rôle majeur dans la régulation de l'expression des protéines et l'analyse des effets des acides ne sera complète qu'à partir du moment où les composantes majeures des différents niveaux d'analyse seront intégrées (transcriptomique, protéomique et fluxomique).

Conclusions et perspectives

Conclusion générale

Les mécanismes par lesquels les acides faibles bloquent la croissance microbienne de *Saccharomyces cerevisiae* ont fait l'objet de nombreuses études qui plaident pour un mécanisme commun de « résistance » à l'inhibition par les acides faibles. Ce potentiel a été corrélé à l'induction de protéines membranaires, à des mécanismes de compétition aux niveaux des transporteurs spécifiques ou à une adaptation physiologique globale relevant de l'énergétique cellulaire.

Selon une démarche expérimentale de microbiologie intégrative descendante, notre objectif était d'identifier et de quantifier les mécanismes induits par l'exposition à des acides faibles propres à doter la cellule d'un acquis réduisant les effets inhibiteurs lors d'une mise en présence ultérieure.

Nous ne reviendrons pas dans le détail des conclusions, largement exposées dans le chapitre V et en fin de chapitre VI, et cette conclusion générale ne reprendra que les faits marquants et originaux relevés lors de cette étude.

Les expérimentations reposent sur la mise en œuvre de cultures discontinues alimentées dont la maîtrise nous a permis le contrôle de l'environnement cellulaire indispensable à la caractérisation cinétique des mécanismes suspectés d'après l'étude bibliographique. Sur la base du génie nutritionnel, ont été validés un milieu de culture chimiquement défini et un mode de conduite garantissant la croissance jusqu'à un haut niveau de concentration cellulaire (80 g.L⁻¹). Ce dernier point est indispensable pour l'atteinte d'une haute réactivité exigée pour la quantification précise des variables biologiques et environnementales.

L'information expérimentale est basée sur l'analyse cinétique fine des réponses à des inductions impulsionnelles répétées et réalisées pour des états physiologiques stabilisés en terme de teneurs en substances de réserves, de capacité respiratoire maximale et de rendement énergétique, obtenus pour différents taux de croissance.

La caractérisation de ces réponses montre que, quel que soit le type d'acide faible et le référentiel « état physiologique », il existe une séquence temporelle de mécanismes caractéristiques se prolongeant sur une période de 3 heures environ.

Instantanément se met en place un mécanisme de régulation du pH intracellulaire avec réexportation des protons par une activité ATPasique induisant une dissipation futile d'énergie pour faire face à la dynamique de diffusion de la forme protonée de l'acide. Ce mécanisme n'est observable que lorsque la cellule possède une capacité respiratoire suffisante pour la surproduction d'énergie oxydative et s'associe à une accumulation concomitante de cations, principalement du potassium, participant à la neutralisation de l'acide. Ensuite survient une deuxième phase qui correspond soit à une accumulation

lente de l'acide non métabolisable (acide sorbique ou propionique pour un métabolisme oxydo-réductif) soit à une dégradation de l'acide faible (acide propionique en métabolisme oxydatif). Durant cette période se poursuivent une lente accumulation intracellulaire de potassium et une mobilisation des réserves comme source énergétique additionnelle. La phase suivante consiste en une reconstitution des sucres de réserves et une extrusion des cations, partielle en ce qui concerne le potassium, pour progressivement atteindre un retour à un métabolisme équilibré. Ce dernier avec une teneur en potassium nettement supérieure à la valeur basale suppose une compartimentation vacuolaire de ce cation.

Le potentiel fermentaire optimal est partiellement restauré lorsque la teneur cellulaire en cations est supérieure à celle requise pour l'homéostasie du pH. Ce phénomène de « résistance » résulte donc d'un état transitoire découlant de la dynamique des mécanismes impliqués dans les régulations du pH intracellulaire et de la pression de turgescence.

Notre approche statistique de l'analyse transcriptomique cinétique n'a pas été assez discriminatoire pour faire ressortir une fonctionnalité précise associée à un état de résistance. Toutefois, elle a permis d'obtenir, selon une catégorisation hiérarchique, des classes cinétiques caractérisées par des fonctions physiologiques (l'énergie, le transport et le métabolisme) et des localisations cellulaires (la mitochondrie en particulier). La redondance entre les deux acides est de nature à conforter nos conclusions premières, à savoir, que ce sont les mécanismes généraux de l'homéostasie cellulaire qui sont impliqués dans la réponse aux acides faibles et non une seule fonctionnalité nouvelle induite.

Approfondissement des acquis obtenus au cours de ce travail

Plusieurs expérimentations seraient nécessaires afin de consolider et de valider des hypothèses de nos travaux actuels. Ainsi, lors de notre culture en métabolisme mixte, nous avons imposé ce métabolisme par une contrainte de conduite (limitation par l'oxygène). Il aurait été intéressant de travailler à un taux de croissance proche du taux de croissance critique correspondant à une capacité respiratoire proche de la vitesse spécifique de respiration *in situ*. Pour un pulse d'acide et avec une réponse identique en terme d'augmentation de la vitesse de respiration, nous devrions observer une bascule « naturelle » vers le métabolisme respiro-fermentaire et ainsi, déterminer les limites dans la réponse oxydative homéostatique.

Dans notre approche, l'acide sorbique a été étudié uniquement en métabolisme oxydatif pur pour lequel nous avons souligné un état d'équilibre qui s'établissait progressivement au cours du temps en terme d'entrée de l'acide et de potassium et en

phase oxydo-réductive non maîtrisée. Il serait nécessaire de reprendre cette analyse complète pour un métabolisme réductif contrôlé, dans les conditions identiques à celles appliquées lors de l'étude de l'acide propionique.

Le rôle du potassium a largement été mis en évidence lors de cette étude. Son approfondissement pourrait être exploré dans des conditions pour lesquelles l'accumulation intracellulaire du potassium provoque son épuisement du milieu de culture. La réponse induite nous permettrait de quantifier l'effet de la limitation sur la restauration de l'homéostasie cellulaire et éventuellement, de révéler des mécanismes alternatifs mis en place par la levure.

Concernant l'étude du CO₂, nous avons été confrontés à des limites de méthodologies en terme de mesure des teneurs en CO₂ intracellulaire et extracellulaire. Nos techniques de prélèvements n'ont pas permis de quantifier ce métabolite avec une précision suffisante permettant une quantification directe des espèces chimiques présentes dans les différentes phases. La participation de cet effecteur ne pourra être établie que lorsque des méthodologies adéquates auront été développées.

Traitement de l'information

Notre objectif pour l'analyse transcriptomique cinétique était de répondre aux hypothèses émises lors de l'analyse macroscopique pour la compréhension des mécanismes impliqués et non de rechercher des cibles précises des réponses cellulaires à un acide.

Lors de cette analyse transcriptomique, nous avons été confrontés à des problèmes de traitement d'un grand nombre de données et de réconciliation des données transcriptomiques et macrocinétiques. Et, il nous apparaît que de nouveaux outils mathématiques capables d'intégrer la masse d'informations ainsi collectée doivent être développés pour une analyse systémique pertinente. Un des enjeux est d'en extraire une information biologique judicieuse, de distinguer les réponses primaires aux modifications environnementales, d'évaluer les réponses indirectes induites afin de dégager certaines hypothèses sur l'identification, la hiérarchisation et la quantification des « systèmes-clés » de régulation. Notre tentative d'analyse statistique comparative n'intègre pas suffisamment l'aspect dynamique qu'il convient encore d'augmenter par une observation transcriptomique plus fréquente.

Les outils mathématiques devront prendre en compte simultanément la dynamique, l'ensemble des données macroscopiques et moléculaires dans leur aspect quantitatif mais aussi qualitatif par leurs fonctionnalités.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguilera, J., Petit, T., de Winde, J.H., Pronk, J.T. (2005a).** Physiological and genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to high carbon dioxide concentrations. *FEMS Yeast Res.* **5**:579-593.
- Aguilera, J., van Dijken, J.P., de Winde, J.H., Pronk, J.T. (2005b).** Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochem J.* Sous presse.
- Alberghina, L., Porro, D., Martegani, E., Ranzi, B.M. (1991).** Efficient production of recombinant DNA proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by controlled high-cell-density fermentation. *Biotechnol Appl Biochem.* **14**:82-92.
- Alexander, M.A., Jeffries, T.W. (1990).** Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. *Enzyme Microb Technol.* **12**:2-19.
- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B. (2001).** Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **498**:98-103.
- Alexandre, H., Plourde, L., Charpentier, C., François, J. (1998).** Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* **144**:1103-1111.
- Anand, S., Prasad, R. (1989).** Rise in intracellular pH is concurrent with 'start' progression of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* **135**:2173-2179.
- Arneborg, N., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2000).** Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. *Arch Microbiol.* **174**:125-128.
- Arneborg, N., Moos, M.K., Jakobsen, M. (1995).** The effect of acetic acid and specific growth rate on acetic acid tolerance and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* **17**:1299-1304.
- Atomi, H., Ueda, M., Suzuki, J., Kamada, Y., Tanaka, A. (1993).** Presence of carnitine acetyltransferase in peroxisomes and in mitochondria of oleic acid-grown *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* **112**:31-34.
- Attfield, P.V. (1997).** Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol.* **15**:1351-1357.
- Bagum, N., Yokoigawa, K., Isobe, Y., Kawai, H. (1998).** Trehalose metabolism and leavening ability of bakers' yeast grown in the presence of sodium chloride. *J Ferment Bioeng.* **86**:457-460.
- Barford, J.P. (1981).** A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a saturated respiratory capacity. *Biotechnol Bioeng.* **23**:1735-1762.
- Barford, J.P. (1990).** A general model for aerobic growth: continuous culture. *Biotechnol Bioeng.* **35**:921-927.
- Barnett, J.A. (1976).** The utilization of sugars by yeasts. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* **32**:125-234.
- Bauer, B.E., Rossington, D., Mollapour, M., Mamnun, Y., Kuchler, K., Piper, P.W. (2003).** Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *Eur J Biochem.* **270**:3189-3195.
- Blocher, J.C., Busta, F.F. (1985).** Inhibition of germinant binding by bacterial spores in acidic environments. *Appl Environ Microbiol.* **50**:274-279.

Blomberg, A. (1997). The osmotic hypersensitivity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is strain and growth media dependent: quantitative aspects of the phenomenon. *Yeast*. **13**:529-539.

Blomberg, A. (2000). Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett*. **182**:1-8.

Blomberg, A., Adler, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. **171**:1087-1092.

Blomberg, A., Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol*. **33**:145-212.

Blomberg, A., Larsson, C., Gustafsson, L. (1988). Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisiae*: osmotolerance in relation to physiological state. *J Bacteriol*. **170**:4562-4568.

Bracey, D., Holyoak, C.D., Coote, P.J. (1998a). Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH? *J Appl Microbiol*. **85**:1056-1066.

Bracey, D., Holyoak, C.D., Nebe-von Caron, G., Coote, P.J. (1998b). Determination of the intracellular pH (pHi) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H⁺-ATPase. *J Microbiol Methods*. **31**:113-125.

Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Rombouts, F.M., Abee, T. (1994). Energy dependent, carrier mediated extrusion of carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*. **60**:1467-1472.

Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Rombouts, F.M., Abee, T. (1996). A novel method for continuous determination of intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6) carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Appl Environ Microbiol*. **62**:178-183.

Brierley, G.P., Settlemire, C.T., Knight, V.A. (1968). Ion transport by heart mitochondria. XI. The spontaneous and induced permeability of heart mitochondria to cations. *Arch Biochem Biophys*. **126**:276-288.

Bruinenberg, P.M., Jonker, R., van Dijken, J.P., Scheffers, W.A. (1985). Utilization of formate as an additional energy source by glucose-limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS 621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. *Arch Microbiol*. **142**:302-306.

Burrows, S. (1970). Baker's Yeast. 349-420. In A.H. Rose and J.S. Harrison (ed.), *The Yeast*, Vol 3. Academic Press, London.

Cabral, M.G., Sa-Correia, I., Viegas, C.A. (2004). Adaptive responses in yeast to the herbicide 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid at the level of intracellular pH homeostasis. *J Appl Microbiol*. **96**:603-612.

Calahorra, M., Martinez, G.A., Hernandez-Cruz, A., Peña, A. (1998). Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast*. **14**:501-515.

Carmelo, V., Sa-Correia, I. (1997). HySP26 gene transcription is strongly induced during *Saccharomyces cerevisiae* growth at low pH. *FEMS Microbiol Lett*. **149**:85-88.

Carmelo, V., Sa-Correia, I. (1997). HySP26 gene transcription is strongly induced during *Saccharomyces cerevisiae* growth at low pH. *FEMS Microbiol Lett*. **149**:85-88.

- Carmelo, V., Santos, H., Sa-Correia, I. (1997).** Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. **1325**:63-70.
- Carmelo, V., Santos, R., Viegas, C.A., Sa-Correia, I. (1998).** Modification of *Saccharomyces cerevisiae* thermotolerance following rapid exposure to acid stress. *Int J Food Microbiol*. **42**:225-230.
- Caron, C. (1995).** Commercial production of baker's yeast and wine yeast. In: Reed G, Nagodawithana TW (eds) *Enzymes, biomass, food and feed*. VCH, Weinheim, 322-351.
- Casal, M., Cardoso, H., Leao, C. (1996).** Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **142**:1385-1390.
- Casal, M., Cardoso, H., Leao, C. (1998).** Effects of ethanol and other alkanols on transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. **64**:665-668.
- Casal, M., Leao, C. (1995).** Utilization of short-chain monocarboxylic acids by the yeast *Torulaspora delbrueckii*: specificity of the transport systems and their regulation. *Biochim Biophys Acta*. **1267**:122-130.
- Casas, E., de Ancos, B., Valderrama, M.J., Cano, P., Peinado, J.M. (2004).** Pentadiene production from potassium sorbate by osmotolerant yeasts. *Int J Food Microbiol*. **94**:93-96.
- Cassio, F., Leao, C., van Uden, N. (1987).** Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. **53**:509-513.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., Young, R.A. (2001).** Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. **12**:323-337.
- Chattopadhyay, S., Muzaffar, N.E., Sherman, F., Pearce, D.A. (2000).** The yeast model for batten disease: mutations in BTN1, BTN2, and HSP30 alter pH homeostasis. *J Bacteriol*. **182**:6418-6423.
- Chen, S.L., Gutmanis, F. (1976).** Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotech Bioeng*. **18**:1455-1462.
- Cheng, L., Moghraby, J., Piper, P.W. (1999).** Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiol Lett*. **170**:89-95.
- Cheng, L., Piper, P.W. (1994).** Weak acid preservatives block the heat shock response and heat-shock-element-directed lacZ expression of low pH *Saccharomyces cerevisiae* cultures, an inhibitory action partially relieved by respiratory deficiency. *Microbiology*. **140**:1085-1096.
- Cimprich, P., Slavik, J., Kotyk, A. (1995).** Distribution of individual cytoplasmic pH values in a population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. **130**:245-252.
- Cole, M.B., Keenan, M.H.J. (1986).** Synergistic effects of weak acid preservatives and pH on the growth of *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast*. **2**:93-100.
- Conway, E.J., Brady, T.G., Carton, E. (1950).** Biological production of acid and alkali. II. A redox theory for the process in yeast with application to the production of gastric acidity. *Biochem J*. **47**:369-374.
- Coote, P.J., Cole, M.B., Jones, M.V. (1991).** Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *J Gen Microbiol*. **137**:1701-1708.

Coutinho, C.C., Bernardes, E., Felix, D., Panek, A.D. (1988). Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. *J Biotechnol.* **7**:23–32.

Crabtree, H.G. (1929). Observation on the carbohydrate metabolism of tumors. *Biochem J.* **23**:536–545.

Crowe, L.M., Mouradian, R., Crowe, J.H., Jackson, S.A., Womersley, C. (1984). Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochim Biophys Acta.* **769**:141–150.

Csonka, L.N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol review.* **53**:121–147.

Cui, Z., Hirata, D., Tsuchiya, E., Osada, H., Miyakawa, T. (1996). The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. *J Biol Chem.* **271**:14712–14716.

Davidson, J.F., Schiestl, R.H. (2001). Cytotoxic and genotoxic consequences of heat stress are dependent on the presence of oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **183**:4580–4587.

Davidson, J.F., Whyte, B., Bissinger, P.H., Schiestl, R.H. (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:5116–5121.

de Deken, R.H. (1966). The Crabtree-effect: A regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol.* **44**:149–156.

de Nobel, H., Lawrie, L., Brul, S., Klis, F., Davis, M., Alloush, H., Coote, P. (2001). Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **18**:1413–1428.

de Vries, S., Marres, C.A. (1987). The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta.* **895**:205–239.

Demidchik, V., Macpherson, N., Davies, J.M. (2005). Potassium transport at the plasma membrane of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast.* **22**:21–29.

Devenish, R.J., Prescott, M., Roucou, X., Nagley, P. (2000). Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim Biophys Acta.* **1458**:428–442.

Egli, T., Fiechter, A. (1981). Theoretical analysis of media used in the growth of yeasts on methanol. *J Gen Microbiol.* **123**:365–369.

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:14863–14868.

Erasmus, D.J., van der Merwe, G.K., van Vuuren, H.J. (2003). Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.* **3**:375–399.

Eraso, P., Gancedo, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **224**:187–192.

Erkmen, O. (2003). Mathematical modeling of *Saccharomyces cerevisiae* inactivation under high-pressure carbon dioxide. *Nahrung.* **47**:176–180.

Evans, C.T., Sumegi, B., Srere, P.A., Sherry, A.D., Malloy, C.R. (1993). ¹³C propionate oxidation in wild-type and citrate synthase mutant *Escherichia coli*: evidence for multiple pathways of propionate utilization. *Biochem J.* **291**:927–932.

- Fernandes, P.M., Domitrovic, T., Kao, C.M., Kurtenbach, E. (2004).** Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett.* **556**:153-160.
- Ferreira, M.M., Loureiro-Dias, M.C., Loureiro, V. (1997).** Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol.* **36**:145-153.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G.F., Kappeli, O. (1981).** Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv Microb Physiol.* **22**:123-183.
- Fleet, G. (1992).** Spoilage yeasts. *Crit Rev Biotechnol.* **12**:1-44.
- Forgac, M. (1999).** Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem.* **274**:12951-12954.
- François, J., Van Schaftingen, E., Hers, H.G. (1986).** Effect of benzoate on the metabolism of fructose 2,6-bisphosphate in yeast. *Eur J Biochem.* **154**:141-145.
- François, J.M., Parrou, J.L. (2001).** Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Rev.* **25**:125-145.
- Freese, E., Sheu, C.W., Galliers, E. (1973).** Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature.* **241**:321-325.
- Gaber, R.F., Styles, C.A., Fink, G.R. (1988).** *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **8**:2848-2859.
- Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A.A. (1999).** Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **15**:879-892.
- Gasch, A.P., Huang, M., Metzner, S., Botstein, D., Elledge, S.J., Brown, P.O. (2001).** Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol Biol Cell.* **12**:2987-3003.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O. (2000).** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* **11**:4241-4257.
- Gasch, A.P., Werner-Washburne, M. (2002).** The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics.* **2**:181-192.
- Gélinas, P., Fiset, G., LeDuy, A., Goulet, J. (1989).** Effect of growth conditions and trehalose content on cryotolerance of baker's yeast in frozen doughs. *Appl Environ Microbiol.* **55**:2453-2459.
- Gerike, U., Hough, D.W., Russell, N.J., Dyall-Smith, M.L., Danson, M.J. (1998).** Citrate synthase and 2-methylcitrate synthase: structural, functional and evolutionary relationships. *Microbiology.* **144**:929-935.
- Gillies, R.J., Ugurbil, K., Den Hollander, J.A., Shulman, R.G. (1981).** ³¹P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci (USA).* **78**:2125-2129.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996).** Life with 6000 genes. *Science.* **274**:546-567.
- Golden, D.A., Beuchat, L.R., Hitchcock, H.L. (1994).** Changes in fatty acid composition of various lipid components of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. *Int J Food Microbiol.* **21**:293-303.

Gonzalez, B., François, J., Renaud, M. (1997). A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast*. **13**:1347-1355.

Groussac, E., Ortiz, M., Francois, J. (2000). Improved protocols for quantitative determination of metabolites from biological samples using high performance ionic-exchange chromatography with conductimetric and pulsed amperometric detection. *Enzyme Microb Technol*. **26**:715-723.

Guillou, V. (1996). Etude du comportement dynamique de *Saccharomyces cerevisiae* en culture continue dans la région oxydative des taux de croissance. Thèse de doctorat INSA Toulouse. France.

Guldfeldt, L.U., Arneborg, N. (1998). Measurement of the effects of acetic acid and extracellular pH on intracellular pH of nonfermenting, individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*. **64**:530-534.

Hamilton, C.A., Taylor, G.J., Good, A.G. (2002). Vacuolar H⁺-ATPase, but not mitochondrial F₁F₀-ATPase, is required for NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. **208**:227-232.

Hatzixanthis, K., Mollapour, M., Seymour, I., Bauer, B.E., Krapf, G., Schuller, C., Kuchler, K., Piper, P.W. (2003). Moderately lipophilic carboxylate compounds are the selective inducers of the *Saccharomyces cerevisiae* Pdr12p ATP-binding cassette transporter. *Yeast*. **20**:575-585.

Hazan, R., Levine, A., Abeliovich, H. (2004). Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. **70**:4449-4457.

Henriques, M., Quintas, C., Loureira-Dias, M.C. (1997). Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependant mechanism. *Microbiology*. **143**:1877-1883.

Holyoak, C.D., Bracey, D., Piper, P.W., Kuchler, K., Coote, P.J. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *J Bacteriol*. **181**:4644-4652.

Holyoak, C.D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M.B., Crimmins, K., Brown, A.J., Coote, P.J. (1996). Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Appl Environ Microbiol*. **62**:3158-3164.

Hounsa, C.G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S., Prior, B.A. (1998). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*. **144**:671-680.

Ingram, M. (1960). Studies on benzoate-resistant yeasts. *Acta Microbiol*. **7**:95-105.

Jansen, R., Greenbaum, D., Gerstein, M. (2002). Relating whole-genome expression data with protein-protein interactions. *Genome Res*. **12**:37-46.

Jones, M.E., Lipmann, F. (1955). Aceto-CoA-kinase. *Methods Enzymol*. **1**:585-591.

Jorgensen, H., Olsson, L., Ronnow, B., Palmqvist, E.A. (2002). Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *Appl Microbiol Biotechnol*. **59**:310-317.

- Kappeli, O. (1986).** Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv Microb Physiol.* **28**:181-209.
- Kashket, E.R. (1985).** The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. *Annu Rev Microbiol.* **39**:219-242.
- Kell, D.B., Peck, M.W., Rodger, G., Morris, J.G. (1981).** On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Biophys Res Commun.* **99**:81-88.
- Kempf, B., Bremer, E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol.* **170**:319-330.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K., Emr, S.D. (1990).** The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev.* **54**:266-292.
- Kockova-Kratochvilova, A. (1990).** Chemical composition of Yeast cells in Yeasts and yeast-like organisms, VCH Publishers, New York.
- Kotyk, A. (1963).** Intracellular pH of baker's yeast. *Folia Microbiol.* **8**:27-31.
- Krebs, H.A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., Bedoya, F. (1983).** Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J.* **214**:657-663.
- Kren, A., Mamnun, Y.M., Bauer, B.E., Schuller, C., Wolfger, H., Hatzixanthis, K., Mollapour, M., Gregori, C., Piper, P., Kuchler, K. (2003).** War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Mol Cell Biol.* **23**:1775-1785.
- Kubo, I., Lee, S.H. (1998).** Potentiation of antifungal activity of sorbic acid. *J Agric Food Chem.* **46**:4052-4055.
- Kuenzi, M.T., Fiechter, A. (1969).** Changes in carbohydrate composition and trehalase-activity during the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Mikrobiol.* **64**:396-407.
- Kuenzi, M.T., Fiechter, A. (1972).** Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. *Arch Mikrobiol.* **84**:254-265.
- Lambert, R.J., Stratford, M. (1999).** Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *J Appl Microbiol.* **86**:157-164.
- Larsson, C., Morales, C., Gustafsson, L., Adler, L. (1990).** Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol.* **172**:1769-1774.
- Larsson, C., Nilsson, A., Blomberg, A., Gustafsson, L. (1997).** Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon- or nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol.* **179**:7243-7250.
- Lewis, J.G., Learmonth, R.P., Watson, K. (1995).** Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* **141**:687-694.
- Leyva, J.S., Peinado, J.M. (2005).** ATP requirements for benzoic acid tolerance in *Zygosaccharomyces bailii*. *J Appl Microbiol.* **98**:121-126.
- Lillie, S.H., Pringle, J.R. (1980).** Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol.* **143**:1384-1394.
- Lodeyro, A.F., Calcaterra, N.B., Roveri, O.A. (2001).** Inhibition of steady-state mitochondrial ATP synthesis by bicarbonate, an activating anion of ATP hydrolysis. *Biochim Biophys Acta.* **1506**:236-243.

Londesborough, J., Varimo, K. (1984). Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem J.* **219**:511-518.

Lopez, R., Enriquez, E., Peña, A. (1999). Effects of weak acids on cation accumulation, delta pH and delta psi in yeast. *Yeast.* **15**:553-562.

Luttik, M.A., Kotter, P., Salomons, F.A., van der Klei, I.J., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *J Bacteriol.* **182**:7007-7013.

Macpherson, N., Shabala, L., Rooney, H., Jarman, M.G., Davies, J.M. (2005). Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiology.* **151**:1995-2003.

McKeon, C., Wolf, B. (1982). Magnesium and magnesium adenosine triphosphate activation of human propionyl CoA carboxylase and beta-methylcrotonyl CoA carboxylase. *Enzyme.* **28**:76-81.

Mesecar, A.D., Nowak, T. (1997). Metal-ion-mediated allosteric triggering of yeast pyruvate kinase. 1. A multidimensional kinetic linked-function analysis. *Biochemistry.* **36**:6792-6802.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* **191**:144-148.

Molenaar, D., Abee, T., Konings, W.N. (1991). Continuous measurement of the cytoplasmic pH in *Lactococcus lactis* with a fluorescent pH indicator. *Biochim Biophys Acta.* **1115**:75-83.

Mollapour, M., Fong, D., Balakrishnan, K., Harris, N., Thompson, S., Schüller, C., Kuchler, K., Piper, P.W. (2004). Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative. *Yeast.* **21**:927-946.

Mollapour, M., Piper, P.W. (2001a). Targeted gene deletion in *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast.* **18**:173-186.

Mollapour, M., Piper, P.W. (2001b). The ZbYME2 gene from the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* confers not only YME2 functions in *Saccharomyces cerevisiae*, but also the capacity for catabolism of sorbate and benzoate, two major weak organic acid preservatives. *Mol Microbiol.* **42**:919-930.

Mori, I.C., Iida, H., Tsuji, F.I., Isobe, M., Uozumi, N., Muto, S. (1998). Salicylic acid induces a cytosolic Ca²⁺ elevation in yeast. *Biosci Biotechnol Biochem.* **62**:986-989.

Nass, R., Rao, R. (1998). Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem.* **273**:21054-21060.

Navon, G., Shulman, R.G., Yamane, T., Eccleshall, T.R., Lam, K.B., Baronofsky, J.J., Marmur, J. (1979). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of wild-type and glycolytic pathway mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* **18**:4487-4499.

Nicolay, K., Scheffers, W.A., Bruinenberg, P.M., Kaptein, R. (1983). In vivo 31P NMR studies on the role of the vacuole in phosphate metabolism in yeasts. *Arch Microbiol.* **134**:270-275.

Nilsson, A., Norbeck, J., Oelz, R., Blomberg, A., Gustafsson, L. (2001). Fermentative capacity after cold storage of baker's yeast is dependent on the initial physiological state but not correlated to the levels of glycolytic enzymes. *Int J Food Microbiol.* **71**:111-124.

- Ohnishi, T. (1973).** Mechanism of electron transport and energy conservation in the site I region of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta*. **301**:105-128.
- Okorokov, L.A., Lichko, L.P., Kulaev, I.S. (1980).** Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium, and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J Bacteriol*. **144**:661-665.
- Olz, R., Larsson, K., Adler, L., Gustafsson, L. (1993).** Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J Bacteriol*. **175**:2205-2213.
- Oura, E. (1977).** Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem*. **4**:19-21.
- Palmieri, L., Lasorsa, F.L., Iacobazzi, V., Runswick, M.J., Palmieri, F., Walker, J.E. (1999).** Identification of the mitochondrial carnitine carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. **462**:472-476.
- Pampulha, M.E., Loureiro-Dias, M.C. (1989).** Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. **31**:547-550.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B., François, J.M. (1999).** Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **15**:191-203.
- Parrou, J.L., François, J.M. (1997).** A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal Biochem*. **248**:186-188.
- Parrou, J.L., Teste, M.A., François, J.M. (1997).** Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*. **143**:1891-1900.
- Pattison, T.L., von Holy, A. (2001).** Effect of selected natural antimicrobials on Baker's yeast activity. *Lett Appl Microbiol*. **33**:211-215.
- Pearce, A.K., Booth, I.R., Brown, A.J. (2001).** Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2,6-bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **147**:403-410.
- Peña, A. (1975).** Studies on the mechanism of K⁺ transport in yeast. *Arch Biochem Biophys*. **167**:397-409.
- Peña, A., Ramirez, J., Rosas, G., Calahorra, M. (1995).** Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J Bacteriol*. **177**:1017-1022.
- Piper, P., Calderon, C.O., Hatzixanthis, K., Mollapour, M. (2001).** Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*. **147**:2635-2642.
- Piper, P., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Muhlbauer, M., Coote, P., Kuchler, K. (1998).** The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J*. **17**:4257-4265.
- Piper, P.W. (1993).** Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. **11**:339-355.
- Piper, P.W. (1999).** Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radic Biol Med*. **27**:1219-1227.
- Piper, P.W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P., Cole, M. (1997).** Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones*. **2**:12-24.

- Pitt, J.I. (1974).** Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. *Food Tech Australia*. **26**:238-241.
- Poilpre, E. (2002).** Mécanisme d'adaptation rapide de *Saccharomyces cerevisiae* en métabolisme oxydatif : implication des sucres de réserve et de la capacité respiratoire. Thèse de doctorat, INSA Toulouse. France.
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., Arino, J. (2000).** The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem*. **275**:17249-17255.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1989).** Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. **55**:468-477.
- Pronk, J.T., van der Linden-Beuman, A., Verduyn, C., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1994).** Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis. *Microbiology*. **140**:717-722.
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Prieto, J.A. (1999).** Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol*. **17**:237-244.
- Ratledge, C. (1991).** Yeast physiology – a micro-synopsis. *Bioprocess Eng*. **6**:195-203.
- Ravindranath, S.D., Fridovich, I. (1975).** Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *J Biol Chem*. **250**:6107-6112.
- Rep, M., Albertyn, J., Thevelein, J.M., Prior, B.A., Hohmann, S. (1999).** Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **145**:715-727.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., Hohmann, S. (2000).** The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem*. **275**:8290-8300.
- Ribeiro, M.J., Reinders, A., Boller, T., Wiemken, A., de Virgilio, C. (1997).** Trehalose synthesis is important for the acquisition of thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol*. **25**:571-581.
- Rieger, M., Käppeli, O., Fiechter, A. (1983).** The role of limited respiration in the complete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. **129**:653-661.
- Rodriguez-Navarro, A. (2000).** Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*. **1469**:1-30.
- Rossell, S., van der Weijden, C.C., Kruckeberg, A., Bakker, B.M., Westerhoff, H.V. (2002).** Loss of fermentative capacity in baker's yeast can partly be explained by reduced glucose uptake capacity. *Mol Biol Rep*. **29**:255-257.
- Rothstein, A. (1959).** Role of the cell membrane in the metabolism of inorganic electrolytes by microorganisms. *Bacteriol Rev*. **23**:175-201.
- Rottenberg, H. (1979).** The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. *Methods Enzymol*. **55**:547-569.
- Ryan, H., Ryan, J.P., O'Connor, W.H. (1971).** The effect of diffusible acids on potassium ion uptake by yeast. *Biochem J*. **125**:1081-1085.
- Ryan, J.P., Ryan, H. (1972).** The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast. *Biochem J*. **128**:139-146.

- Sandmann, T., Herrmann, J.M., Dengjel, J., Schwarz, H., Spang, A. (2003).** Suppression of coatomer mutants by a new protein family with COPI and COPII binding motifs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. **14**:3097-3113.
- Schüller, C., Mamnun, Y.M., Mollapour, M., Krapf, G., Schuster, M., Bauer, B.E., Piper, P.W., Kuchler, K. (2004).** Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. **15**:706-720.
- Schulze, U. (1995).** Anaerobic physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat, Dpt of Biotechnology - Technical University Denmark.
- Serrano, R. (1978).** Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem*. **22**:51-63.
- Sharma, K.G., Mason, D.L., Liu, G., Rea, P.A., Bachhawat, A.K., Michaelis, S. (2002).** Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell*. **1**:391-400.
- Sharma, S.C. (1997).** A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. **152**:11-15.
- Shima, J., Hino, A., Yamada-Iyo, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori, K., Takano, H. (1999).** Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial Baker's yeast. *Appl Environ Microbiol*. **65**:2841-2846.
- Singer, M.A., Lindquist, S. (1998).** Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell*. **1**:639-648.
- Slavik, J. (1982).** Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *FEBS Lett*. **140**:22-25.
- Slayman, C.L., Moussatos, V.V., Webb, W.W. (1994).** Endosomal accumulation of pH indicator dyes delivered as acetoxymethyl esters. *J Exp Biol*. **196**:419-438.
- Smits, H.P., Hauf, J., Muller, S., Hobley, T.J., Zimmermann, F.K., Hahn-Hagerdal, B., Nielsen, J., Olsson, L. (2000).** Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **16**:1325-1334.
- Sols, A., Gancedo, C., de la Fuente, G. (1971).** The Yeasts. Vol 2, 271-307. In A.H. Rose and J.S. Harrison (ed.) Academic Press, London.
- Sonnleitner, B (1991).** Dynamics of yeast metabolism and regulation. *Bioprocess Biosyst Eng*. **6**:187-193.
- Sonnleitner, B., Käppeli, O. (1986).** Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol Bioeng*. **28**:927-937.
- Sousa, M.J., Miranda, L., Corte-Real, M., Leao, C. (1996).** Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environments. *Appl Environ Microbiol*. **62**:3152-3157.
- Spicher, G., Brummer, J.M. (1995).** Baked good. 244-265. In a H.J. Rehm and G. Reed (ed.), *Biotechnology, Enzymes Biomass food and feed*, Vol 9.
- Steels, E.L., Learmonth, R.P., Watson, K. (1994).** Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*. **140**:569-576.
- Stratford, M., Anslow, P.A. (1996).** Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Lett*. **142**:53-58.

Stratford, M., Anslow, P.A. (1998). Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic "weak acid preservative". *Lett App Microbiol.* **27**:203-206.

Strub, C. (2005). Impact du CO₂ sur les dynamiques microbiennes. DEA INSA Toulouse. France.

Sychrova, H. (2004). Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res.* **53**(Suppl. 1):S91-S98.

Tabuchi, T., Uchiyama, H. (1975). Methylcitrate condensing and methylisocitrate cleaving enzymes ; evidence for the pathway of oxidation of propionyl-CoA to pyruvate via C₇-tricarboxylic acids. *Agric biol chem.* **39**:2035-2042.

Talla, E., Tekai, F., Brino, L., Dujon, B. (2003). A novel design of whole-genome microarray probes for *Saccharomyces cerevisiae* which minimizes cross-hybridization. *BMC Genomics.* **4**:38.

Tenreiro, S., Rosa, P.C., Viegas, C.A., Sa-Correia, I. (2000). Expression of the AZR1 gene (ORF YGR224w), encoding a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily, is required for adaptation to acetic acid and resistance to azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **16**:1469-1481.

Thevelein, J.M. (1984). Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev.* **48**:42-59.

Thevelein, J.M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast.* **10**:1753-1790.

Thevelein, J.M., Beullens, M., Honshoven, F., Hoebeeck, G., Detremmerie, K., den Hollander, J.A., Jans, A.W. (1987a). Regulation of the cAMP level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: intracellular pH and the effect of membrane depolarizing compounds. *J Gen Microbiol.* **133**:2191-2196.

Thevelein, J.M., Beullens, M., Honshoven, F., Hoebeeck, G., Detremmerie, K., Griewel, B., den Hollander, J.A., Jans, A.W. (1987b). Regulation of the cAMP level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the glucose-induced cAMP signal is not mediated by a transient drop in the intracellular pH. *J Gen Microbiol.* **133**:2197-2205.

Thomas, D.S., Davenport, R.R. (1985). *Zygosaccharomyces bailii*—a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiol.* **2**:157-169.

Thomsson, E., Larsson, C., Albers, E., Nilsson, A., Franzen, C.J., Gustafsson, L. (2003). Carbon starvation can induce energy deprivation and loss of fermentative capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **69**:3251-3257.

Tosteson, D.C., Hoffman, J.F. (1960). Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J Gen Physiol.* **44**:169-194.

Trollmo, C., André, L., Blomberg, A., Adler, L. (1988). Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* **56**:321-326.

Uchiyama, H., Tabuchi, T. (1976). Properties of methylcitrate synthase from *Candida lipolytica*. *Agric biol chem.* **40**:1411-1418.

Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.F. (1964). Manometric techniques. 4th Edn, Burgess Publishing Company, Minneapolis.

Uribe Larrea, J.L., Pacaud, S., Goma, G. (1985). New method for measuring the cell water content by thermogravimetry. *Biotechnol Lett.* **7**:75-80.

Valle, E. (1986). Trehalase activation in yeasts is mediated by an internal acidification. *Eur J Biochem.* **154**:247-251.

- van den Berg, M.A., de Jong-Gubbels, P., Kortland, C.J., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., Steensma, H.Y. (1996).** The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J Biol Chem.* **271**:28953-28959.
- van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P., Thevelein, J.M. (1995).** Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Environ Microbiol.* **61**:109-115.
- van Hoek, P., de Hulster, E., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2000b).** Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnol Bioeng.* **68**:517-523.
- van Hoek, P., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1998).** Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Appl Environ Microbiol.* **64**:4226-4233.
- van Hoek, P., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2000a).** Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* **26**:724-736.
- van Uden, N. (1984).** Temperature profiles of yeasts. *Adv Microb Physiol.* **25**:195-251.
- van Urk, H., Schipper, D., Breedveld, G.J., Mak, P.R., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1989).** Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Biochim Biophys Acta.* **992**:78-86.
- van Urk, H., Voll, W.S.L., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1990).** Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Appl Environ Microbiol.* **56**:281-287.
- Varela, J.C., Praekelt, U.M., Meacock, P.A., Planta, R.J., Mager, W.H. (1995).** The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol.* **15**:6232-6245.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1990a).** Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J Gen Microbiol.* **136**:395-403.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1990b).** Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J Gen Microbiol.* **136**:405-412.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1992a).** Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast.* **8**:501-517.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1992b).** Y_{ATP} and P/O ratio in glucose-limited cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse. Delft University Technology, The Netherlands.
- Verduyn, C., Stouthamer, A.H., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1991).** A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **59**:49-63.
- Viegas, C.A., Almeida, P.F., Cavaco, M., Sa-Correia, I. (1998).** The H(+)-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in octanoic acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Appl Environ Microbiol.* **64**:779-783.
- Viegas, C.A., Cabral, M.G., Teixeira, M.C., Neumann, G., Heipieper, H.J., Sa-Correia, I. (2005).** Yeast adaptation to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid involves increased membrane fatty acid saturation degree and decreased *OLE1* transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* **330**:271-278.

- Viegas, C.A., Sa-Correia, I. (1991).** Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J Gen Microbiol.* **137**:645-651.
- Viegas, C.A., Sebastiao, P.B., Nunes, A.G., Sa-Correia, I. (1995).** Activation of plasma membrane H(+)-ATPase and expression of *PMA1* and *PMA2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at supraoptimal temperatures. *Appl Environ Microbiol.* **61**:1904-1909.
- Visser, W., Scheffers, W.A., Batenburg-van der Vegte, W.H., van Dijken, J.P. (1990).** Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol.* **56**:3785-3792.
- Walker, G.M. (1994).** The roles of magnesium in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol.* **14**:311-354.
- Walser, P., Pfenninger, S., Spinner, C. (2001).** Manuel suisse des denrées alimentaires, agents conservateurs pour denrées alimentaires.
- Warth, A.D. (1977).** Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *J Appl Bacteriol.* **43**:215-230.
- Warth, A.D. (1988).** Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Appl Environ Microbiol.* **54**:2091-2095.
- Warth, A.D. (1989a).** Relationships between the resistance of yeasts to acetic, propanoic and benzoic acids and to methyl paraben and pH. *Int J Food Microbiol.* **8**:343-349.
- Warth, A.D. (1989b).** Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol.* **135**:1383-1390.
- Warth, A.D. (1991).** Effect of benzoic acid on glycolytic metabolite levels and intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **57**:3415-3417.
- Wegener, W.S., Reeves, H.C., Rabin, R., Ajl, S.J. (1968).** Alternate pathways of metabolism of short-chain fatty acids. *Bacteriol Rev.* **32**:1-26.
- Wei, Y., Lee, J.M., Richmond, C., Blattner, F.R., Rafalski, J.A., LaRossa, R.A. (2001).** High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **183**:545-556.
- Weitzel, G., Pilatus, U., Rensing, L. (1987).** The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat-shock protein inducing treatments in yeast. *Exp Cell Res.* **170**:64-79.
- Weston, S.A., Parish, C.R. (1990).** New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods.* **133**:87-97.
- Wiemken, A. (1990).** Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **58**:209-217.
- Wood, J.M. (1999).** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**:230-262.
- Wood, V., Rutherford, K.M., Ivens, A., Rajandream, M.A., Barrell, B. (2001).** A re-annotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Comp Funct Genomics.* **2**:143-154.
- Yale, J., Bohnert, H.J. (2001).** Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem.* **276**:15996-16007.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., Serrano, R. (2002).** The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* **21**:920-929.

Nomenclature et abréviations

a	Aire spécifique d'échange entre la phase gaz et la phase liquide (m^{-1})
[A]_{exo}	Concentration d'acide propionique exocellulaire (mM)
[A]_{in}	Concentration d'acide propionique intracellulaire (mM)
[A]_{injectée}	Concentration d'acide propionique injectée dans le réacteur (mM)
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
K	Constante de partage de l'acide
k_L	Coefficient de transfert de masse dans la phase liquide (m.h^{-1})
P/O	Ratio entre le nombre de moles d'ATP formées et le nombre moles d'oxygène consommées
PEP	Phosphoénolpyruvate
pH_i	pH intracellulaire
pH_v	pH vacuolaire
pH_{exo}	pH du milieu de culture
pKa	Antilogarithme de la constante de dissociation de l'acide
PLS	Phosphorylation liée au substrat
p_{O2}[*] et p_{O2}	Pressions partielles en O ₂ dissous dans la phase liquide respectivement à saturation et au cours de la culture (% de la saturation)
q_{ci}	Vitesse spécifique pour le composé c _i ($\text{mmol de i.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
QR	Quotient respiratoire
r_{O2}	Vitesse de consommation de l'oxygène ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
r_{CO2}	Vitesse de production du CO ₂ ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
R_{SX}	Rendement de conversion du substrat en biomasse
μ	Taux de croissance (h^{-1})
V_{cyto}	Volume cytoplasmique (mL.g^{-1})
V_{liq}	Volume occupé par le liquide (L)
V_{total}	Volume occupé par le liquide et par la biomasse (L)
X	Concentration cellulaire (g.L^{-1})
Y_{ATP}	Rendement en biomasse par mol d'ATP générée dans le catabolisme
Y_{ATP, acide}[*]	Rendement en moles ATP produites par mole d'acide intracellulaire